

Biodisponibilidade de antocianinas do vinho de mesa

Hélder José Couto Oliveira

Dissertação de Mestrado em Bioquímica apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2014





Biodisponibilidade de antocianinas do vinho de mesa

Hélder José Couto Oliveira

Mestrado em Bioquímica

Departamento de Química e Bioquímica

2014

Orientador

Professor Doutor Nuno Filipe da Cruz Baptista Mateus,
Professor Associado, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

Coorientador

Doutora Iva Luzia Fernandes, Doutorada, Faculdade de
Ciências da Universidade do Porto

Coorientador

Doutora Natércia Brás, Doutorada, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto



AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração e o apoio de várias pessoas e instituições.

Desta forma gostaria de expressar o meu agradecimento:

Ao Professor Doutor Nuno Mateus, orientador deste trabalho, pelo seu apoio e disponibilidade e persistência, pelas suas críticas e sugestões, pelo dinamismo e pela confiança que depositou em mim.

Ao Professor Doutor Victor Freitas pela forma como ajudou no desenvolvimento deste trabalho, pela forma como sempre se mostrou disponível a ajudar e a conversar e pela boa disposição.

À Doutora Iva Fernandes por ter coorientado este trabalho. Sem ela nada disto teria sido possível. Obrigado pela paciência, pela disponibilidade, pelas críticas e correções, pelas lições imprescindíveis para o trabalho e para o meu futuro.

À Doutora Natércia Brás por ter coorientado este trabalho na parte computacional sempre com um sorriso na cara e pronta a ensinar. Obrigado por me confirmares que a química computacional é uma area de investigação incrível.

A todos os elementos do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências, que em algum momento contribuíram para a realização deste trabalho. À Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e em especial, ao Departamento de Química e Bioquímica por ser responsável pelo meu crescimento académico e científico.

A todas as pessoas que trabalham no Laboratório de Química Orgânica. Em particular, o André, a Ana Luísa, a Ana Faria, a Elsa, a Joana Azevedo, a Joana Oliveira, a Natércia, o Luís, a Paulinha, o Ricardo e a Susana que de uma forma ou de outra deram o seu apoio, por se terem mostrado sempre disponíveis para me ajudarem e pelas pessoas que são, pelos momentos de alegria que passamos juntos e pela vossa energia contagiante. À Maria por ter sido uma excelente aluna de estágio, dedicada e trabalhadora, e por ter concluído o seu estágio curricular com sucesso.

Obrigado à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto por me ter acolhido como aluno de Mestrado.

Obrigado ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar por me ter acolhido como aluno de Mestrado.

Aos amigos, pelos bons e maus momentos passados, pelas brincadeiras, pelas chatices, por me fazerem rir tantas vezes. Longe ou perto, isto não se perde.

Ao meu pai por ser, acima de tudo, um amigo.

Obrigado à minha irmã, à Paula, ao meu “mano” Francisco, à minha sobrinha e em apoiado ao longo desta jornada.

Obrigado à Sofia, por ter estado sempre ao meu lado em todas as decisões, por ter sido um porto de abrigo nos momentos mais difíceis e por ser o meu dia-a-dia.

À minha mãe....

A vida continuou, eu cresci e
todos os dias tento fazer com
que te sintas orgulhosa de mim.

Até já.

RESUMO

As antocianinas representam um conjunto de fitoquímicos que tem vindo a ganhar importância crescente na área dos nutracêuticos.

Os vários estudos que têm sido realizados neste sentido associaram este grupo de polifenóis a diversas funções benéficas para a saúde. Estão reportadas associações com a prevenção de doenças degenerativas e cardiovasculares, com a prevenção e combate a doenças oncológicas, entre outros.

No entanto, ainda pouco se sabe acerca dos mecanismos metabólicos envolvidos nesta bioatividade. Neste sentido, é necessário tentar compreender quais os componentes celulares envolvidos nestas ações.

As antocianinas são, normalmente, constituintes de uma dieta normal, o que faz com que sejam ingeridas diariamente, havendo a necessidade de serem absorvidas pelo organismo de forma a exercerem atividade biológica.

Assim, este trabalho consistiu numa abordagem molecular ao nível da absorção das antocianinas ao nível do estômago, usando como modelo celular a linha de células humanas de adenocarcinoma gástrico MKN-28.

Como fonte antociânica foi usado um vinho de mesa, ao qual foi eliminado o álcool e o conteúdo em açúcares. Foi avaliada a eficiência de transporte das 7 antocianinas presentes no vinho de mesa através das células MKN-28. A eficiência de transporte das antocianinas totais foi dependente do tempo de incubação, atingindo um máximo de aproximadamente 6% ao fim de 3 horas.

Na presença de etanol, o transporte de antocianinas não mostrou ser mais elevado.

Na presença de glucose, o transporte diminuiu drasticamente sugerindo uma competição por parte das antocianinas para o mecanismo de transporte deste açúcar.

A exposição prévia a antocianinas por parte das células de estômago revelou uma maior eficácia no transporte, sugerindo uma possível adaptação a este fator externo de modo a maximizar a eficácia.

A pH mais baixo o transporte foi mais eficaz, sugerindo que as espécies típicas dos meios mais ácidos poderão ter mais facilidade em ser absorvidas.

O efeito inibidor da presença de glucose sobre o transporte das antocianinas observado a nível experimental levou à realização de um estudo computacional de interação antocianina/GLUT. Foram realizadas análises de docking e dinâmica molecular onde se utilizaram 3 antocianinas (cianidina-3-glucose; delphinidina-3-glucose e malvidina-3-glucose) em dois estados (catião flavílio e hemiacetal) e o transportador de glucose humano GLUT-1.

Todas as antocianinas mostraram ter afinidade para com o transportador e capacidade de formar complexos estáveis.

O local de ligação das antocianinas ao GLUT1 contém aminoácidos envolvidos na ligação de outros compostos como a glucose, o que sugere uma conservação do mecanismo de interação ligando/recetor. Para além disso, alguns resíduos estão em zonas do transportador envolvidas no mecanismo de transporte, o que realça o efeito da ligação das antocianinas.

Palavras chave: antocianina, polifenol, glucose, GLUTs, biodisponibilidade.

ABSTRACT

The anthocyanins represent a set of phytochemicals that has gained an increasing importance in the field of nutraceuticals.

The multiple studies that have been conducted combined with this group of polyphenols several health beneficial functions. There are associations that had been referred with the prevention and combat of degenerative, cardiovascular and oncological diseases, among others.

However little is known about the metabolic mechanisms concerned in bioactivity. To that end, it's necessary to try to understand which celular components are involved in these actions.

Anthocyanins are normally present in a regular diet, which causes them to be taken daily with a need to be absorbed in order to exert biological activity.

That said, this work has consisted in a molecular approach with regard to anthocyanins absorption in the gastric level, using as a barrier model, a human gastric cancer cell line MKN-28.

As an anthocyanin source, it was used a table wine, in which the acohol and sugar content were eliminated. The transport efficiency of 7 anthocyanins present in table wine, was evaluated through the MKN-28 cells. This efficiency trasport of the total group of anthocyanins relied on the incubation time, reaching a maximum of approximately 6% after 3 hours.

In the ethanol presence, the anthocyanins absorption hasn't shown to be any higher. In the glucose presence, the absorption has decreased drastically, suggesting a competition by the anthocyanins for this sugar transport mechanism.

The prior exposure to anthocyanins by the gastric cells showed a higher efficiency in absorption, implying a possible adaptation to this external factor in order to maximize effectiveness.

In a lower pH, the transportation was more effective, suggesting that the typical species of more acidic environments may find it easier to be absorbed.

The inhibitory effect of glucose on anthocyanin transport prompted the theoretical study of the interaction between anthocyanins and GLUTs. A computational study was performed using three anthocyanins (delphinidin-3-glucose, malvidin-3-glucose and cyanidin-3-glucose) in two different states (and hemiacetal flavylum cation) and the human glucose transporter GLUT – 1. Docking and molecular dynamics analysis were carried out. All anthocyanins show affinity for the carrier and ability to form stable complexes. The binding site of anthocyanins contain amino acids involved in binding other compounds such as glucose, suggesting a conserved mechanism of interaction. In addition, some residues of the carrier involved in the capture, are involved in the transport mechanism, which enhances the effect of anthocyanins binding.

Keywords: anthocyanin, polyphenol, glucose, GLUTs, bioavailability.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VII
ÍNDICE.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABELAS.....	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIX
ORGANIZAÇÃO DA TESE.....	XXI
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	3
1.1. Polifenóis.....	5
1.2. Flavonóides.....	7
1.3. Antocianinas.....	9
1.3.1. A química estrutural das antocianinas.....	9
1.3.2. Efeito da co-pigmentação.....	12
1.3.3. Interação com iões metálicos.....	14
1.3.4. Influência do pH.....	15
1.3.5. Ocorrência de antocianinas nas plantas.....	17
1.3.6. As antocianinas em fontes alimentares.....	19
1.3.7. A toxicidade da antocianinas e as suas propriedades pro e antioxidantes.....	20
1.3.8. As antocianinas na quimioprevenção e no combate ao cancro.....	23
1.4. Biodisponibilidade.....	25
1.4.1. A biodisponibilidade das antocianinas.....	26

1.4.2. A absorção, distribuição, metabolismo e transporte de antocianinas nos diferentes tecidos.....	33
2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1. Reagentes e Suportes.....	43
3.2. Obtenção do extrato de antocianinas.....	43
3.3. Caracterização por análise cromatográfica em HPLC e uHPLC.....	43
3.4. Culturas celulares.....	44
3.5. Avaliação da viabilidade celular.....	45
3.6. Ajuste do pH apical.....	45
3.7. Estudos de Transporte.....	45
3.7.1. Estudos de transporte com etanol, glucose pH e exposição prévia a antocianinas.....	46
3.8. Análise Estatística.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1. Variação da resistência elétrica transepitelial das células MKN-28.....	52
4.2. Influência do Etanol e do Dimetilsulfóxido na resistência elétrica transepitelial das células MKN-28.....	54
4.3. Viabilidade celular da linha MKN-28 sujeita a diferentes concentrações de etanol.....	56
4.4. Efeito do etanol no transporte de antocianinas na linha celular MKN-28.....	58
4.5. Influência da glucose no transporte de antocianinas pela linha celular MKN-28.....	65
4.6. Influência do pH no transporte de antocianinas pela barreira gástrica...	68
4.7. Exposição prévia a antocianinas e o seu papel no transporte destas....	70
4.8. Otimização de um método de análise de antocianinas do uHPLC.....	72
CAPÍTULO II.....	77
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	79
1.1. Dinâmica Molecular.....	82
1.2. Docking Molecular.....	83
1.2.1. A mecânica do docking.....	85
1.2.1.1. Algoritmo de procura.....	85
1.2.1.2. Função de Scoring.....	87

1.2.2. Aplicações.....	87
2. OBJETIVOS.....	89
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	91
3.1. Preparação das estrutura proteica.....	93
3.2. Docking Molecular.....	93
3.3. Dinâmica Molecular.....	94
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	97
4.1. Homólogo bacteriano do transportador de glucose.....	99
4.2. Docking molecular das antocianinas no transportador homólogo Xyle.....	100
4.3. Transportador de glucose humano GLUT1.....	103
4.4. Docking molecular das antocianinas no transportador de glucose humano GLUT1 (4PYP).....	104
4.5. Dinâmica molecular da interação do GLUT humano com as antocianinas.....	108
4.5.1. Root-Mean-Square deviation (RMSd).....	109
4.5.2. Root-Mean-Square Fluctuation (RMSF).....	110
4.5.3. Análise das interações proteína-ligando.....	113
4.5.4. Hidratação do local de ligação das antocianinas.....	123
CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
ANEXOS.....	149

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do núcleo flavânico.....	7
Figura 2. a) Estrutura de antocianina-3-glucósido e b) estrutura de uma antocianina-3,5-diglucósido.....	11
Figura 3. Interações das antocianinas. (A) auto-associação; (B) co-pigmentação intramolecular; (C) complexação com metais; (D) complexação intermolecular. Adaptado de Castañeda-Ovando <i>et al.</i> 2009.....	13
Figura 4. Estruturas químicas das antocianinas dependendo do pH. $R_1 = H$ ou ose; R_2 e $R_3 = H$ ou Metilo (adaptado de Castañeda-Ovando <i>et al.</i> 2009).....	16
Figura 5. Reação de degradação de antocianinas a pH superior a 7 (adaptado de Castañeda-Ovando <i>et al.</i> 2009).....	17
Figura 6. A dieta mediterrânica em pirâmide. Fonte: Conselho Científico de Saúde, Ministério da Saúde Helénico.....	20
Figura 7. Diagrama simplificado da biocinética de um composto (adaptado de Byers <i>et al.</i> 2009).....	26
Figura 8. Efeito do pH no equilíbrio de antocianinas monoglucósido, não aciladas. Adaptado de Fernandes <i>et al.</i> 2014.....	30
Figura 9. Vias de absorção de antocianinas.....	34
Figura 10. Vias hepáticas de destoxificação. Adaptado de Lyska <i>et al.</i> 2006.....	36
Figura 11. Esquema do método de Transwell.....	46
Figura 12. Variação da resistência elétrica transepitelial (TEER) ao longo de 7 dias de cultura, à temperatura de 37° C. Número de ensaios realizados = 3.....	53
Figura 13. Variação da resistência elétrica transepitelial (TEER) antes da aplicação (colunas da esquerda) e ao fim de 3 horas (colunas da direita) de DMSO e etanol.....	55
Figura 14. Expressão matemática representativa do cálculo da viabilidade celular da linha MKN-28.....	56
Figura 15. . Representação gráfica da viabilidade da linha celular MKN-28 exposta a diferentes concentrações de etanol.....	57
Figura 16. Cromatograma representativo da fração apical (preto) e da fração basolateral ao fim de 180 minutos (azul). 1 - delfinidina-3-glucose; 2 – petunidina-3-glucose; 3 – peonidina-3-glucose; 4 – malvidina-3-glucose; 5 – malvidina-3-acetilglucose; 6 – malvidina-3-cumaroílgucose.....	58
Figura 17. Representação gráfica da eficiência de transporte de antocianinas pela linha celular MKN-28 a diferentes concentrações de etanol. s/ EtOH – 0% etanol; c/ EtOH – 4% etanol. ** $p < 0,05$	59
Figura 18. Representação gráfica da eficiência de transporte de antocianinas pela linha celular MKN-28 a diferentes concentrações de glucose (0, 20, 40, 60, 80, 100, 250 e 500 mM + 5,5 mM). * $p < 0,1$, *** $p < 0,01$	64

Figura 19. Representação da estrutura geral de uma antocianina com destaque para o resíduo de glucose.....	65
Figura 20. Representação gráfica da eficiência de transporte de antocianinas pela linha celular MKN-28 a diferentes valores de pH (5 e 7). *** $p < 0,01$	69
Figura 21. Representação gráfica da eficiência de transporte de antocianinas pela linha celular MKN-28 com e sem exposição prévia a antocianinas. * $p < 0,1$	71
Figura 22. Cromatograma representativo do perfil antociânico de um vinho de mesa, em HPLC, segundo o gradiente de eluição: 0-70 min: 80%A – 15%A; 70-90 min: 100% B isocrático; 90-130 min: 80%A e 20% B isocrático, Fluxo 1,0 mL/min. Volume de injeção 50 μ L. Detecção a 520 nm. Solventes: A – 10% HCOOH; B- 10%HCOOH/ 30%ACN. 1 - delfinidina-3-glucose; 2 – cianidina-3-glucose; 3 – petunidina-3-glucose; 4 – peonidina-3-glucose; 5 – malvidina-3-glucose, 6 – derivado acético da malvidina-3-glucose; 7 – derivado cumárico da malvidina-3-glucose.....	73
Figura 23. Cromatograma representativo do perfil antociânico de um vinho de mesa segundo o gradiente de eluição: 0 – 8 min: 100% A – 65% A; 8 – 9 min: 65% A – 0% A; 9 – 11 min: 100% B isocrático; 11 – 12 min: 100% B – 0% B; 12 – 15 min: 100% A isocrático. Fluxo 0,5 mL/ min. Volume de injeção 10 μ L. Detecção a 520 nm. Solventes: solvente A – 1% HCOOH; solvente B – 1% HCOOH/ 30% ACN.....	74
Figura 24. Cromatograma representativo do perfil antociânico de um vinho de mesa segundo o gradiente de eluição: 0 – 6 min: 93% A – 70% A; 6 – 6,1 min: 70% A – 0% A; 6,1 – 9 min: 100% B isocrático; 9 – 15 min: 97% A , 3% B isocrático. Fluxo 0,5 mL/ min. Volume de injeção 10 μ L. Detecção a 520 nm. Solventes: solvente A – 5% HCOOH; solvente B – 100% ACN.....	75
Figura 25. Cromatograma representativo do perfil antociânico de um vinho de mesa segundo o gradiente de eluição: 0 – 7 min: 94,5% A – 64% A; 7 – 10 min: 64% A – 20% A; 10 – 10,1 min: 20%A – 0%A; 10,1 – 12 min: 100% B isocrático; 12 – 15 min: 94,5% A , 5,5% B isocrático. Fluxo 0,5 mL/ min. Volume de injeção 10 μ L. Detecção a 520 nm. Solventes: solvente A – 5% HCOOH; solvente B – 100% ACN.....	76
Figura 26. Representação esquemática do docking molecular.....	84
Figura 27. Coordenação da D-glucose com Xyle. A D-glucose é representada a preto e vermelho. Estão representados os resíduos do centro de ligação da glucose à proteína e a verde representados os resíduos que são semelhantes nos GLUT1-4 humanos e no homólogo Xyle. (adaptado de Sun <i>et al.</i> 2012).....	99
Figura 28. Local de <i>docking</i> da glucose (a amarelo) e das antocianinas (Cy-3-glc, Dp-3-glc, Mv-3-glc) nas formas de hemiacetal e catião flavílio no homólogo bacteriano do transportador de glucose Xyle (código: 4GBZ).....	102
Figura 29. Mapa de resíduos do homólogo bacteriano Xyle presentes no local de ligação das antociainas.....	103
Figura 30. Comparação das estruturas cristalográficas do GLUT1 humano (4PYP) e do homólogo Xyle (4GBZ). A verde encontra-se a estrutura cristalográfica do homólogo bacteriano Xyle e a laranja a estrutura cristalográfica do GLUT1 humano.....	104

Figura 31. Local de <i>docking</i> da glucose (a amarelo) e das antocianinas (Cy-3-glc, Dp-3-glc, Mv-3-glc) nas formas de hemiacetal e catião flavílio no transportador de glucose humano GLUT-1 (código: 4PYP).	105
Figura 32. Mapa de resíduos do GLUT1 humano presentes no local de ligação das antocianinas.....	107
Figura 33. Valores de RMSF para o GLUT1 humano (4PYP) complexado com cianidina-3-glucose, delfinidina-3-glucose e malvidina-3-glucose na forma de catião flavílio. S1 e S2 representam as duas melhores soluções obtidas pelo <i>docking</i> molecular.....	111
Figura 34. Representação dos resíduos do GLUT1 humano (4PYP) com valores de RMSF mais elevados (a amarelo).....	112
Figura 35. Valores de RMSF para o GLUT1 humano (4PYP) complexado com cianidina-3-glucose, delfinidina-3-glucose e malvidina-3-glucose na forma hemiacetal. S1 e S2 representam as duas melhores soluções obtidas pelo <i>docking</i> molecular.....	113
Figura 36. Destaque do resíduo Glu372 e da hélice α TM7 (Sun <i>et al.</i> 2012) (a amarelo) do transportador de glucose humano GLUT1 (4PYP).....	122
Figura 37. Conformações aberta e fechada da Xyle (4GBZ) e do GLUT1 humano (4PYP) para o citoplasma. A vermelho está representado o homólogo Xyle e a verde o GLUT1 humano.....	124
Anexo A. Cromatograma representativo da fração apical (preto) e da fração basolateral ao fim de 180 minutos (azul). 1 - delfinidina-3-glucose; 2 – petunidina-3-glucose; 3 – peonidina-3-glucose; 4 – malvidina-3-glucose; 5 – malvidina-3-acetilglucose; 6 – malvidina-3-cumaroílgucose.....	150
Anexo I. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da cianidina-3-glucose (S1) na sua forma de cetião flavílio ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.....	151
Anexo II. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da cianidina-3-glucose (S2) na sua forma de cetião flavílio ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.....	152
Anexo III. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da delfinidina-3-glucose (S1) na sua forma de cetião flavílio ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.....	153
Anexo IV. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da delfinidina-3-glucose (S2) na sua forma de cetião flavílio ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.....	154
Anexo V. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da malvidina-3-glucose (S1) na sua forma de catião flavílio ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.....	155
Anexo VI. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da malvidina-3-glucose (S2) na sua forma de catião flavílio ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.....	156

Anexo VII. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da cianidina-3-glucose (S1) na sua forma de hemiacetal ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.....	157
Anexo VIII. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da cianidina-3-glucose (S2) na sua forma de hemiacetal ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.....	158
Anexo IX. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da delphinidina-3-glucose (S1) na sua forma de hemiacetal ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.....	159
Anexo X. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da delphinidina-3-glucose (S2) na sua forma de hemiacetal ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.....	160
Anexo XI. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da malvidina-3-glucose (S1) na sua forma de hemiacetal ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.....	161
Anexo XII. Valores de RMSd para os catiões das antocianinas durante a simulação de dinâmica molecular. CyS1 – solução 1 da cianidina-3-glucose; CyS2 – solução 2 da cianidina-3-glucose; DpS1- solução 1 da delphinidina-3-glucose; DpS2 – solução 2 da delphinidina-3-glucose; MvS1 – solução da malvidina-3-glucose; MvS2 – solução 2 da malvidina-3-glucose.....	162
Anexo XIII. Valores de RMSd para os hemiacetais das antocianinas durante a simulação de dinâmica molecular. CyS1 – solução 1 da cianidina-3-glucose; CyS2 – solução 2 da cianidina-3-glucose; DpS1- solução 1 da delphinidina-3-glucose; DpS2 – solução 2 da delphinidina-3-glucose; MvS1 – solução da malvidina-3-glucose; MvS2 – solução 2 da malvidina-3-glucose.....	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura geral das principais classes de flavonóides.....	8
Tabela 2. Representação da estrutura das antocianinas (catião flavílio) masi comuns na natureza e respetivo comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$). Glc – glucose.....	10
Tabela 3. Concentração em antocianinas em frutos, vegetais e bebidas (adaptado de Clifford <i>et al.</i> 2000).....	18
Tabela 4. Biocinética das antocianinas em humanos após administração oral (adaptado de Daayf <i>et al.</i> 2008). $C_{\text{máx}}$ – concentração máxima; $t_{\text{máx}}$ – tempo para atingir a concentração máxima; $t_{1/2}$ – tempo de semivida de eliminação.....	27
Tabela 5. Valores de energia livre de associação ($\Delta G_{\text{associação}}$) obtidos para as duas melhores soluções do <i>docking</i> molecular de cada antocianina nas duas conformações testadas e indicação do substituinte mais interno no canal do transportador.....	102
Tabela 6. Valores de energia livre de associação ($\Delta G_{\text{associação}}$) obtidos para as duas melhores soluções do <i>docking</i> molecular de cada antocianina nas duas conformações testadas e indicação do substituinte mais interno no canal do transportador	
Tabela 7. Pontes de hidrogénio formadas entre o catião da cianidina-3-glucose (S1) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.....	115
Tabela 8. Pontes de hidrogénio formadas entre o catião da cianidina-3-glucose (S2) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.....	116
Tabela 9. Pontes de hidrogénio formadas entre o catião da delphinidina-3-glucose (S1) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.....	116
Tabela 10. Pontes de hidrogénio formadas entre o catião da delphinidina-3-glucose (S2) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.....	117
Tabela 11. Pontes de hidrogénio formadas entre o catião da mavidina-3-glucose (S1) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos	

aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.....	117
Tabela 12. Pontes de hidrogénio formadas entre o catião da malvidina-3-glucose (S2) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.....	118
Tabela 13. Pontes de hidrogénio formadas entre o hemiacetal da cianidina-3-glucose (Se) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.....	118
Tabela 14. Pontes de hidrogénio formadas entre o hemiacetal da cianidina-3-glucose (S2) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.....	119
Tabela 15. Pontes de hidrogénio formadas entre o hemiacetal da delphinidina-3-glucose (S1) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.....	119
Tabela 16. Pontes de hidrogénio formadas entre o hemiacetal da delphinidina-3-glucose (S2) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.....	120
Tabela 17. Pontes de hidrogénio formadas entre o hemiacetal da malvidina-3-glucose (S1) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.....	120
Tabela 18. Número médio de águas presentes no local de ligação à distância de 3 Å e entre 3 e 5 Å para as formas catião flavílio das respetivas antocianinas.....	124
Tabela 19. Número médio de águas presentes no local de ligação à distância de 3 Å e entre 3 e 5 Å para as formas hemiacetal das respetivas antocianinas.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs - Absorvância

AMBER – Assisted Model Building with Energy Refinement

Caco-2 - Células derivadas de carcinoma de cólon humano com diferenciação enterocítica

C_{máx} - Concentração plasmática máxima

COMT - Catecol-O-Metil-Transferase

Cy3glc - Cianidina-3-glicose

Dp3glc - Delfinidina-3-glicose

EPM - Erro Padrão da Média

FSH - Hormona de Estimulação Folicular

GLUT1 - Transportador de glicose por difusão facilitada tipo 1

GLUT2 - Transportador de glicose por difusão facilitada tipo 2

GSH - Glutathione

HPLC-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Detector de Barra de Díodos

MKN-28 - Linha celular derivada de adenocarcinoma epitelial gástrico

Mv3glc - Malvidina-3-glicose

Pg3glc – Pelargonidina-3-glucose

Pn3glc – Peonidina-3-glucose

Pt3glc – Petunidina-3-glucose

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SFB - Soro Fetal de Bovino

SGLT1 - Cotransportador glicose/sódio

uHPLC- Ultra Cromatografia Líquida

ORGANIZAÇÃO DA T ESE

A presente tese está organizada em dois capítulos. Estes dois capítulos pretendem demonstrar as duas grandes áreas que foram abrangidas neste trabalho: a química e bioquímica experimental e computacional.

O capítulo I surge no âmbito do trabalho experimental desenvolvido, que abrange o estudo das antocianinas na sua interação com um modelo celular de barreira gástrica. Pretende-se nesta parte do trabalho estudar o transporte das antocianinas ao nível do estômago, uma vez que a sua rápida deteção no plasma não parece ser compatível com a absorção no epitélio intestinal. Adicionalmente estes pigmentos têm sido cada vez mais associadas a propriedades benéficas para a saúde. Para isso foram testadas diferentes variáveis para perceber de que modo este transporte é influenciado.

O capítulo II surge, por sua vez, como um complemento ao trabalho desenvolvido no capítulo I. Os métodos computacionais são cada vez mais uma ferramenta de investigação poderosa que permitem concluir acerca de diversos fenómenos biológicos e químicos como por exemplo, a interação entre proteínas e ligandos. Assim, de acordo com os resultados obtidos no capítulo I, realizou-se o estudo da interação de antocianinas com o transportador de glucose GLUT-1.

CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE ANTOCIANINAS DO VINHO DE MESA NA LINHA CELULAR TUMORAL MKN-28.

INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Polifenóis

Os polifenóis são metabolitos secundários derivados do metabolismo de diversas plantas, que exercem um papel importante nos sistemas de defesa das plantas contra patogénicos e estão presentes em larga escala na dieta normal. Assim, são importantes na proteção contra raios UV, contra a ação de radicais livres, entre outros, e foram recentemente documentados como antifúngicos e antimicrobianos (Daglia *et al.* 2012). Para além destas funções protetoras, os polifenóis também exercem atividade ao nível das plantas tendo papéis importantes no crescimento, na maturação dos frutos e no desenvolvimento das características sensoriais e organoléticas (Golstein and Swain 1963; Bonhevi and Coll 1963; Harborne and Williams 2000).

Várias definições têm sido atribuídas ao termo “polifenol”, no entanto uma das que parece ser a mais correta surgiu de Quideau e seus colaboradores (2011). Segundo estes autores um verdadeiro polifenol é um metabolito das plantas derivado exclusivamente da via metabólica do chiquimato e da via dos policetídeos, contendo mais que um anel fenólico e estando depletado de qualquer grupo funcional azotado na sua estrutura mais básica.

Esta definição deixa de fora as estruturas monofenólicas, assim como as suas variantes naturais como éteres metilfenílicos e O-fenilglicósidos.

Evidências crescentes sugerem que os polifenóis são sérios candidatos para explicar os efeitos protetores dos alimentos derivados das plantas como o vinho, ao azeite, as frutas e os legumes. Estas associações têm surgido com a concordância existente nos vários estudos realizados até à data que sustentam a hipótese que uma alimentação baseada em alimentos com alto teor de flavonóides (como é o caso da dieta mediterrânica) pode desempenhar um papel importante na redução de doenças cardiovasculares através do melhoramento de funções vasculares (Habauzit *et al.* 2012). Também existem referências de redução de outras patologias como cancro e doenças neurodegenerativas (Hollman and Katan 1999; Kaur and Kapoor 2001).

Esta associação inversa entre o consumo de polifenóis e o risco de doenças crónicas tem aumentado o interesse da comunidade científica na investigação destes compostos na expectativa de encontrar produtos com propriedades de

excelência para combater determinadas doenças. O sustento nos produtos naturais na tentativa de encontrar curas efetivas para determinadas patologias é cada vez maior.

O grupo fenólico dos polifenóis pode aceitar um eletrão para formar complexos consideravelmente estáveis. Isto atribui aos polifenóis a capacidade de exercer funções que envolvam transferências de eletrões, como por exemplo quebrar reações de oxidação nos componentes celulares (Clifford 2000). Está também bem estabelecido que ao alimentos ricos em polifenóis podem aumentar a capacidade antioxidante do plasma. Este aumento pode ser explicado tanto pela presença de polifenóis redutores e dos seus metabolitos no plasma como pelo comportamento destes na presença de outros agentes redutores. É importante ter conta, no entanto, que apesar de ser, na maioria dos casos, o combate ao stress oxidativo a principal causa atribuída ao efeito dos polifenóis, que estes poderão exercer as suas funções de outra forma (Scalbert and Williamson 2000).

No caso do cancro, estão já referenciadas várias associações benéficas da ação dos polifenóis. Consequentemente, uma dissecação sistemática do potencial quimiopreventivo dos polifenóis tem vindo a ser feita. Dados os desafios da terapia oncológica, o uso de agentes naturais ou sintéticos para impedir, travar ou reverter nos seus estadios iniciais o tumor continua a ser a perspetiva mais promissora de tratamento. Até à data, vários estudos feitos em modelos celulares, modelos animais e humanos, têm testado o efeito dos vários polifenóis em diferentes tipo de cancro (Yang *et al.* 2001; Singh *et al.* 2009; Cui *et al.* 2010). Várias explicações para os mecanismos envolvidos na eficácia quimiopreventiva destes compostos incluem a sua habilidade para interromper o processo carcinogénico através da interferência com a rede de sinalização intracelular envolvida na iniciação e promoção do tumor, ou a capacidade de reverter ou parar a progressão (Manson 2003). Podem também ativar a apoptose das células tumorais através da modulação de elementos chave na transdução de sinal como as caspases (Manson 2003; Surh 2003). A mais recente investigação sugere que os polifenóis poderão atuar ao nível da modulação epigenética para exercer efeitos inibitórios na promoção do cancro (Link *et al.* 2010)

O uso dos polifenóis como suplementos alimentares deve ser comedido, uma vez que vários antioxidantes podem exercer funções prooxidantes em determinadas condições, como por exemplo a concentração administrada (Lee and Lee 2006). Estima-se que a ingestão diária de polifenóis seja aproximadamente 1 grama (Scalbert and Williamson 2000).

1.2. A classe dos Flavonóides

Mais de 8000 estruturas polifenólicas estão identificadas em várias espécies de plantas. Todos estes compostos surgem de um intermediário comum, a fenilalanina. Para além disto todos eles têm em comum a existência de pelo menos um anel aromático contendo grupos hidroxilo (Boudet *et al.* 2007). Estes compostos podem, no entanto, se divididos em duas grandes classes, a classe dos flavonóides e a classe dos não flavonóides.

A classe dos flavonóides é o conjunto de compostos polifenólicos mais amplamente estudado (tabela 1). Mais de 4000 variedades de flavonóides estão identificadas, muitas das quais responsáveis pelas cores das flores, frutos e folhas (de Groot *et al.* 1998).

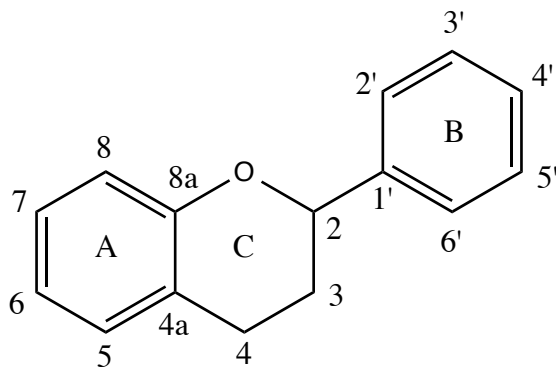


Figura 1. Estrutura do núcleo flavânico.

A sua estrutura básica, o núcleo flavânico, consiste num esqueleto heterocíclico constituído por um anel benzénico condensado com um anel pirano, onde na posição 2 ou 3 se encontra associado um grupo fenilo (Figura 1).

Dentro desta classe existem 6 classes principais, agrupadas de acordo com o grau de oxidação do anel pirano (C): os flavonóis, as flavonas, as isoflavonas, as flavanonas, as antocianidinas e os flavan-3-óis. Existem ainda as chalconas. Os flavonóides mais abundantes nas grânhas e nos vinhos provenientes de *Vitis vinifera*, são os flavonóis, os flavan-3-óis e os glucósidos de antocianidinas. As diferenças individuais surgem da variação no número e disposição dos grupos hidroxilo e a extensão da glicosilação e alquilação.

Tabela 1. Estrutura geral das principais classes de flavonóides.

Flavonóides	Flavonóis		R ₁ =H; R ₂ =OH, R ₃ =H: Canferol R ₁ =OH; R ₂ =OH; R ₃ =H: Quercetina R ₁ =OH; R ₂ =OH; R ₃ = OH: Miricetina
	Flavonas		R ₁ =H; R ₂ =OH: Apigenina R ₁ =OH; R ₂ =OH: Luteolina
			R ₁ =H; R ₂ =OH, R ₃ =H: Catequina R ₁ =OH; R ₂ =H; R ₃ =H: Epicatequina R ₁ =OH; R ₂ =OH; R ₃ = OH: Galhocatequina
	Flavan-3-óis		
	Isoflavonas		R ₁ =H: Daidzeína R ₁ =OH: Genisteína
	Flavanonas		R ₁ =H; R ₂ =H, R ₃ =OH: Naringenina R ₁ =OH; R ₂ =OH; R ₃ =OMe: Hesperetina
	Chalconas		R ₁ =OMe: Xantumol R ₁ =OH: 8-Prenilnaringenina
	Antocianidinas		R ₁ =H; R ₂ =H: Pelargonidina (Pg) R ₁ =OH; R ₂ =H: Cianidina (Cy) R ₁ =OH; R ₂ =OH: Delfinidina (Dp) R ₁ =OMe; R ₂ =OH: Petunidina (Pt) R ₁ =OMe; R ₂ =H: Peonidina (Pn) R ₁ =OMe; R ₂ =OMe: Malvidina (Mv)

1.3. Antocianinas

1.3.1. A química estrutural das antocianinas

O estudo dos corantes naturais é uma extensa e ativa de investigação devido ao aumento do interesse da substituição de corantes sintéticos, geralmente com efeitos tóxicos para os seres humanos (Chun et al. 2007).

As antocianinas (tabela 2) constituem o maior e provavelmente o mais importante grupo de pigmentos naturais solúveis em água (Takeoka and Dao 2002). Até à data mais de 635 antocianinas foram identificadas na natureza (He and Giusti 2010). Este grupo de flavonoides é responsável pelos tons azuis, roxos e vermelhos dos frutos, flores e vegetais (Andersen *et al.* 2008). Estão descritas como sendo importantes para as plantas com diversas funções modeladoras de fatores externos como a atração dos animais para efeitos de polinização. Dada a sua forte capacidade para absorver luz, estas podem também ser importantes na proteção das plantas contra as radiações ultravioleta (Harborne *et al.* 2000).

As antocianinas são usadas como corantes na indústria das bebidas. Com o aumento da preocupação acerca do uso de corantes sintéticos nos alimentos, as indústrias têm vindo a apostar cada vez mais no uso de compostos naturais.

Tal como outros polifenóis, as antocianinas estão também descritas como benéficas para a saúde humana. Estão descritos na prevenção de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, cancro e asma, entre outros (Konczak *et al.* 2004).

As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonoides. As suas agliconas partilham um esqueleto com três anéis aromáticos (A, B e C), em que A e C estão conjugados. As antocianinas constituem a forma glicosilada das antocianidinas (agliconas).

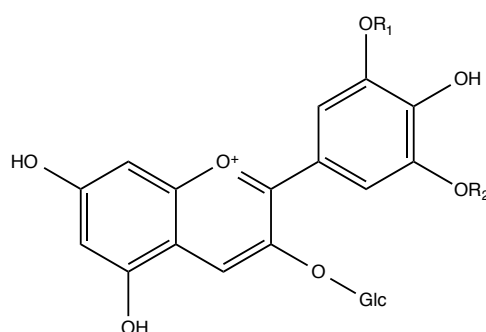
Graças ao longo cromóforo formado pelas 8 ligações duplas conjugadas transportando uma carga positiva no anel C, na forma de catião flavílio, as antocianinas são intensamente coradas em condições acídicas. O máximo de absorção na zona do visível situa-se normalmente entre os 465 e os 550 nm, enquanto que o outro máximo se situa entre 270 e 280 nm (Eder 2000).

As diferenças nos padrões de hidroxilação e metilação nas diferentes posições dos anéis fazem com que até data tenham sido identificadas cerca de 25 antocianidinas

na natureza (Stintzing *et al.* 2004; Andersen *et al.* 2006; Kong *et al.* 2003; Rein 2005).

No entanto apenas 6 delas são normalmente encontradas, e aproximadamente 95% de todas as antocianinas são derivadas destas 6 antocianidinas: cianidina (Cy), peonidina (Pn), pelargonidina (Pg); malvidina (Mv), petunidina (Pt) e delphinidina (Dp) (Kong *et al.* 2003).

Tabela 2. Representação da estrutura das antocianinas (catião flavílio) mais comuns na natureza e respetivo comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$). Glc - glucose



Antocianina	R ₁	R ₂	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Pg-3-glc	H	H	503; 431
Pn-3-glc	OCH ₃	H	517
Cy-3-glc	OH	H	516
Mv-3-glc	OCH ₃	OCH ₃	528
Pt-3-glc	OCH ₃	OH	526
Dp-3-glc	OH	OH	524

A cor varia entre as agliconas. Quanto mais hidroxilado for o anel B mais o espetro se aproxima dos tons azuis; pelo contrário, para as antocianidinas com o anel B menos hidroxilado e com substituintes são exibidos tons vermelhos (Delgado-Vargas *et al.* 2003, Heredia *et al.* 1998).

Os grupos hidroxilo nas agliconas podem ser substituídos por açúcares, que por sua vez podem ligar-se a outros açúcares através de pontes glicosídicas ou serem acilados com ácidos orgânicos aromáticos e alifáticos através de esterificação. Tanto a glicosilação com a acilação afetam as propriedades físico-químicas das antocianinas no sentido em que modificam o seu peso molecular e a polaridade do molécula. A glicosilação aumenta a solubilidade em água, enquanto que a acilação

provoca uma diminuição. Como tal, as formas aglicona são raramente encontradas na natureza por serem instáveis. A glicosilação aumenta a estabilização das antocianinas devido à formação de uma rede intramolecular (ver ponto x) de pontes de hidrogénio na molécula de antocianina (Borkwski *et al.* 2005).

Os açúcares mais comuns associados às antocianinas são geralmente a glucose e a ramnose e encontram-se tipicamente ligados ao oxigénio do carbono 3, podendo também aparecer na posição C5-O. Mais raramente o açúcar pode ligar-se na posição C7-O e no anel B. A distribuição da glicosilação é muito variada existindo antocianinas monoglicosiladas e poliglicosiladas. No entanto, as antocianinas mais abundantes são as 3-glucósido e as 3,5-diglucósido (figura 2).

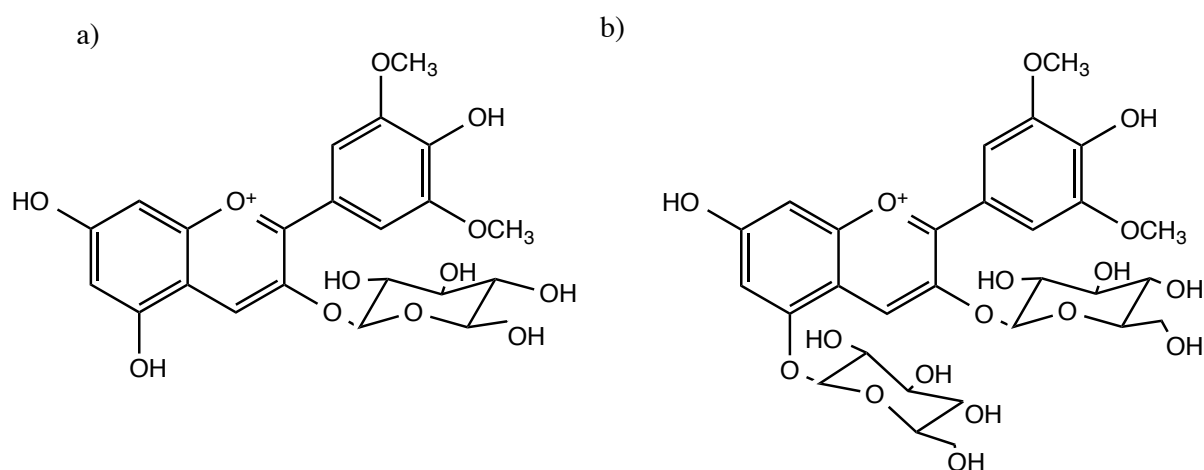


Figura 2. a) Estrutura de uma antocianina-3-glucósido e b) estrutura de uma antocianina-3,5-diglucósido.

1.3.2. Efeito da co-pigmentação

A co-pigmentação é um fenómeno em que os pigmentos antociânicos e outros compostos orgânicos, ou iões metálicos, formam associações moleculares e complexos, gerando uma mudança ou incremento na intensidade da cor (Boulton 2001). Na área da ciência alimentar, este fenómeno é considerado uma interação muito importante pois a cor é um factor de qualidade crucial na avaliação de um produto quando se trata das características organoléticas (Eiro *et al.* 2002). Alguns estudos sugerem que a co-pigmentação de antocianinas com outros compostos (os co-pigmentos) é o principal mecanismo de estabilização da cor as plantas (Davies *et al.* 1993, Mazza *et al.* 1990). Os co-pigmentos são, geralmente, sistemas ricos em eletrões π capazes de fazer associações com os catiões flavílio, que são, por sua vez, pobres em eletrões. Esta associação confere proteção aos ataques nucleofílicos da água na posição 2 do catião flavílio (Matsufuji *et al.* 2003) e para outras espécies como peróxidos e dióxidos de enxofre na posição 4 (García-Viguera *et al.* 1999).

Os co-pigmentos são geralmente incolores, mas quando misturados com uma solução de antocianinas, é produzida uma interação que promove um efeito hipercrómico e um *shift* batocrómico no espetro de absorção (na região UV-visível). Os co-pigmentos podem ser flavonóides, amino-ácidos, ácidos orgânicos, nucleótidos, polissacarídeos, metais ou mesmo outras antocianinas.

A interação antocianina-co-pigmento pode ser levada a cabo a partir de 5 formas diferentes dependendo das espécies envolvidas (Figura 3). Se o co-pigmento é outra antocianina, uma auto-associação ou co-pigmentação intramolecular é formada (Figura 3A e 3B); quando a interação é com um metal, uma complexação é originada (Figura 3C); no caso de co-pigmentos com pares de eletrões livres, ocorre uma co-pigmentação intermolecular (Figura 3D); finalmente, no caso mais complexo, a co-pigmentação pode ser feita por várias espécies diferentes ao mesmo.

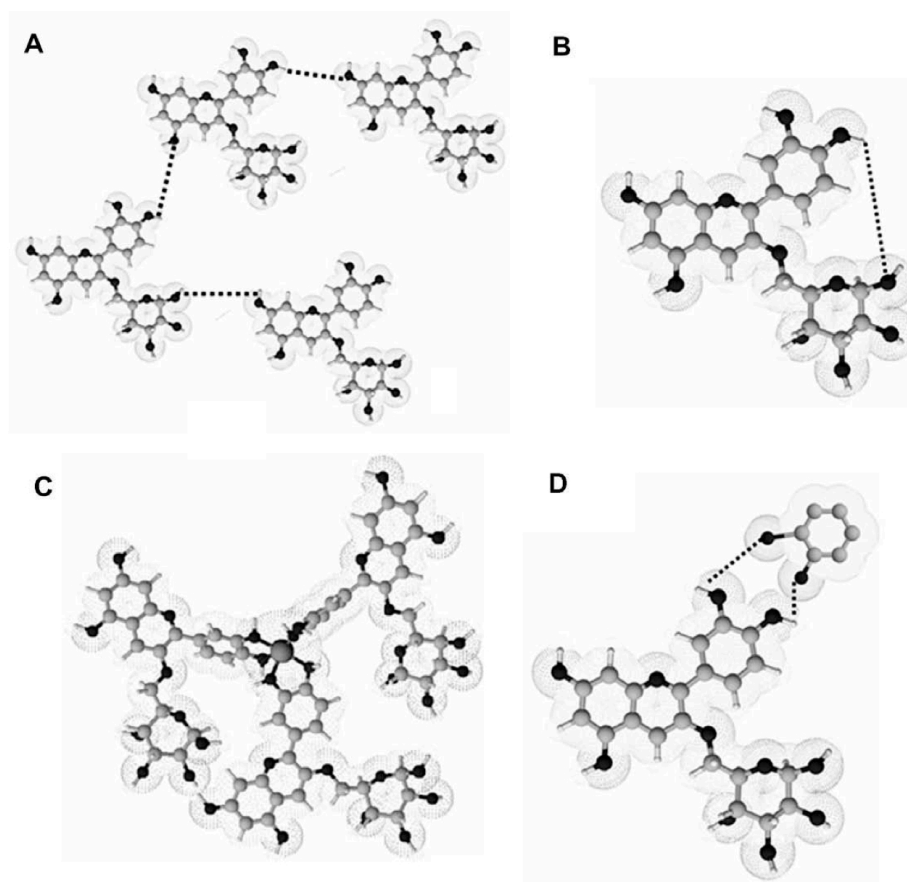


Figura 3. Interações das antocianinas. (A) auto-associação; (B) co-pigmentação intramolecular; (C) complexação com metais; (D) complexação intermolecular. Adaptado de Castañeda-Ovando *et al.* 2009.

Quando o co-pigmento é outro composto polifenólico, a interação é transitória devido à falta de ligações químicas. Este comportamento é o resultado do fenómeno química conhecido como formação de complexos de transferência de carga ou interações π - π (Foster *et al.* 1969); este fenómeno ocorre quando compostos de cargas opostas interagem. Assim, nos anéis ligados por uma ligação fraca, a densidade eletrónica é transferida do anel mais carregados para os menos carregados. Assim, como o catião flavílio das antocianinas é carregado positivamente, é um bom candidato para a formação de complexos por transferência de carga com substratos ricos em eletrões.

O resultado global da co-pigmentação é baseado em dois efeitos: (1) a formação de complexos π - π que causa mudanças nas propriedades espectroscópicas das moléculas de catião flavílio, aumentando a intensidade de absorção (efeito hiperocrómico) e no comprimento de onda (*shift* batocrómico); e (2) a estabilização da forma flavílio pelo complexo π move o equilíbrio de tal forma que a intensidade da cor vermelha aumenta.

1.3.3. Interação com iões metálicos

A variedade de cores nas plantas foi inicialmente explicada pela formação de quelatos entre catiões flavílio e metais (Clifford *et al.* 2000). Apesar do reduzido interesse da indústria alimentar acerca das complexações antocianina-metal, esta interação constitui uma alternativa viável para a estabilização das cores; particularmente se os metais envolvidos não implicam riscos para a saúde ou se fazem parte de minerais essenciais na dieta.

Uma das características das antocianinas e antocianidinas com grupos hidroxilo no anel B (Cy, Dp, Pt), é a sua habilidade para formar complexos metal-antocianina (Boulton 2001) (Tabela). Alguns estudos sobre a estabilidade da cor em plantas, sugerem que as cores azuis devem-se à complexação entre antocianinas e alguns metais como alumínio, ferro, cobre e estanho (Starr *et al.* 1973) e magnésio (Hale *et al.* 2001). Na interação antocianina-alumínio (III), a complexação foi feita com Cy ou outros derivados flavonóides, levando à descoberta que este processo estabiliza a base quinoidal (azulada) evitando a oxidação (Moncada *et al.* 2003). Outros autores, ao estudar a variação de cor da camada exterior de uma uva Hindu adicionando soluções de molibdénio (IV e V), verificaram que em ambos os casos se deu uma estabilização da cor azul, sugerindo uma possível complexação antocianina-molibdénio. Estudos mais recentes mostraram que a complexação entre os grupos hidroxilo das antocianinas e iões de ferro (III) ou magnésio (II) a pH 5 é essencial para o desenvolvimento de cor azul nas plantas, particularmente se o rácio estequiométrico antocianina: ferro (III) ou magnésio (III) é 1:6 ou maior (Yoshida *et al.* 2006).

1.3.4. Influência do pH

As antocianinas podem ser encontradas sobre a forma de diferentes estruturas que dependem do pH da solução (Figura 4) (da Costa *et al.* 1998; Fleschurt *et al.* 2006; Heredia *et al.* 1998; Kennedy *et al.* 2000). A cor das antocianinas é resultado da conjugação dos eletrões π nos anéis A-C. A quebra desta conjugação resulta na perda de cor por parte das antocianinas o que acontece em determinadas situações como o aumento do pH da solução. Outros fatores como a temperatura, luz e presença de outros compostos fenólicos têm também efeitos na estabilidade dos pigmentos antocianicos.

Em soluções aquosas ácidas, as antocianinas existem em quatro formas principais em equilíbrio: o catião flavílio de cor vermelha, a base quinoidal de cor azul, a pseudobase carbinol incolor e a chalcona de cor amarela. A pH inferior a 1, o catião flavílio (cor vermelha) é a espécie predominante e contribui para as cores vermelhas e roxas. À medida que o pH aumenta, ocorre hidratação do catião flavílio pelo ataque nucleofílico da água que origina o aparecimento da forma de base carbinol incolor; a partir de pH 3 começam a surgir as formas chalcona e a proporção de catião flavílio diminui bruscamente, traduzindo-se numa diminuição importante da cor vermelha em solução. Para valores de pH entre 3 e 4, todas as formas de equilíbrio estão presentes, predominando as bases carbinol incolores. A pH entre 5 e 6, apenas duas espécies incolores são geralmente observadas, as pseudo bases carbinol, as chalconas e quinonas. Para valores de pH superiores a 7, as antocianinas são degradadas dependendo dos seus substituintes (figura 5) (Castañedo-Ovando *et al.* 2009). No entanto, se não forem degradadas, existe predominantemente uma mistura da base quinoidal violeta e do respetivo anião azul, traduzindo-se numa cor azulada da solução.

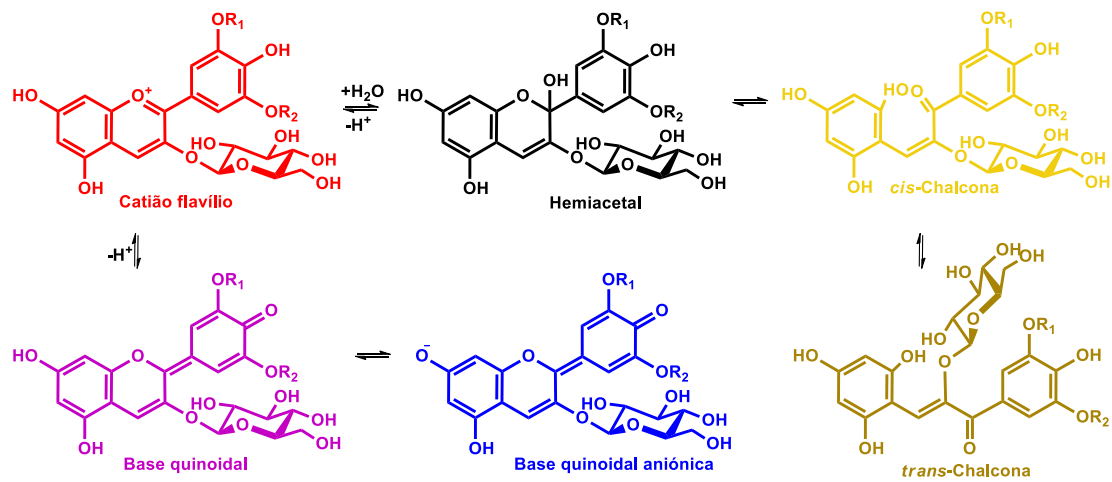


Figura 4. Estruturas químicas das antocianinas dependendo do pH. R_1 e R_2 = H, OH ou OMetilo (adaptado de Mazza e Brouillard 1990).

A estabilização das antocianinas depende sobretudo de fatores externos. A natureza e disposição das substituições efetuadas no esqueleto do pigmento antociânico vão definir a sua maior ou menor capacidade de estabilizar nas condições a que está sujeita. Um destes exemplos é a substituição na posição C4, que geralmente inibe a ligação de moléculas de água e ácido sulfônico, impedindo a formação de espécies incolores. No vinho, certos pigmentos antociânicos apresentam estas substituições, o que lhes atribui características mais estáveis em meios aquosos originando as cores intensas típicas desta bebida.

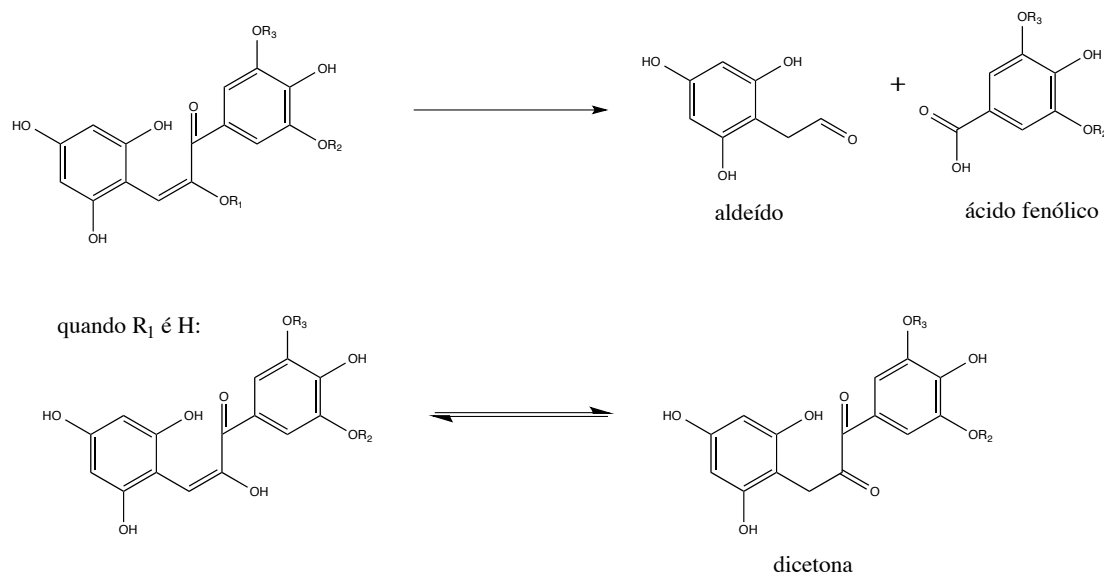


Figura 5. Reação de degradação de antocianinas a pH superior a 7. R_1 = ose; R_2 e R_3 = H ou Metilo (adaptado de Castañeda-Ovando *et al.* 2009)

A estabilidade das antocianidinas é influenciada pelas substituições feitas no anel B e pela presença de grupos hidroxilo e metoxilo adicionais que diminuem a estabilidade da aglicona em meio neutro; assim, a pelargonidina (Pg) é a antocianidina mais estável (Fleschhut *et al.* 2006). Em contraste com as agliconas, os derivados monoglucósidos, e principalmente, os diglucósidos são mais estáveis em condições de pH neutras. Este comportamento é explicado graças à capacidade das moléculas de açúcar possuem para evitar a degradação de intermediários instáveis em ácidos fenólicos e aldeídos (Figura 5).

1.3.5. Ocorrência de Antocianinas nas Plantas

As fontes de antocianinas comestíveis encontradas na natureza incluem frutos como cerejas, amoras, morangos e vegetais como cebola-vermelha, feijão, milho roxo, batata doce, etc (Wu *et al.* 2006).

Apesar de normalmente se encontrarem acumuladas em flores e frutos, as antocianinas estão também presentes nas folhas, sementes e órgãos de

armazenamento, sendo produzidas nos vacúolos (Shahidi *et al.* 2004). O conteúdo total de antocianinas varia substancialmente entre as diferentes espécies de plantas (Wu *et al.* 2006), sendo que os dados disponíveis mostram que os frutos vermelhos têm normalmente o maior conteúdo em antocianinas por dose (tabela 3). Fatores ambientais como a luz e a temperatura também afetam o conteúdo total de antocianinas de uma forma considerável (Shahidi *et al.* 2004).

A abundância das seis antocianidinas mais comuns nas plantas também varia bastante. Alguns frutos, como os morangos, contêm um número limitado de pigmentos antociânicos, enquanto que, por outro lado, frutos como o mirtilo contêm matrizes antociânicas muito complexas. A distribuição destas antocianidinas tem sido analisada com algumas contradições entre os vários estudos. Em 2003, Kong e seus colaboradores estimaram a distribuição da seguinte maneira: Cy (50%), Pg (12%), Pn (12%), Dp (12%), Pt (7%) e Mv (7%). Numa publicação mais recente, a abundância foi distribuída da seguinte maneira Cy (30%), Dp (22%), Pg (18%), Pn (7,5%), Mv (7,5%) e Pt (5%) (Andersen *et al.* 2006). Em ambos os estudos, as 3 antocianinas não metiladas mostraram estar presentes em maior quantidade (Cy, Dp e Pg) na natureza que as 3 antocianinas metiladas (Pn, Mv e Pt). Considerando que mais de 90% das antocianinas contêm glucose (Andersen *et al.* 2006), não é uma surpresa que a Cy-3-glc seja a antocianina mais abundante na natureza (Kong *et al.* 2003).

Tabela 3. Concentração em antocianinas em frutos, vegetais e bebidas (adaptado de Clifford *et al.* 2000).

Origem	Concentração antocianinas (mg/L ou mg/Kg)
Mirtilos	4600
Amora	820-1800
Uva-do-monte	825-5030
Cereja	3500-4500
Groselha	460-2000
Uvas tintas	300-7500
Laranja Vermelha	2000
Ameixa	20-250
Framboesa vermelha	100-600
Framboesa preta	1700-4277
Morango	150-350

Repolho	250
Beringela	7500
Rabanete	110-600
Beterraba	150-450
Milho Roxo	16420
Cebola	>250
Vinho Tinto	240-350
Vinho do Porto	140-1100

1.3.6. As antocianinas em fontes alimentares

As fontes de antocianinas presentes na dieta incluem para além de diversas frutas e vegetais, alimentos processados derivados de frutos e bebidas como sumos e vinho tinto. O consumo global de antocianinas está estimado em 10000 toneladas anuais, apenas de uvas tintas (Clifford 2000). A ingestão diária destes compostos polifenólicos foi estimada em 180-215 mg por pessoa (Kuhnau 1976). Mais recentemente esta dose foi estimada num espetro que abrange desde 12,5 (Wu *et al.* 2006) a 150 mg/dia (Heinonen *et al.* 2007).

Ainda assim, este é um número significativamente superior quando comparado com outros fitoquímicos com propriedades benéficas para a saúde. É preciso notar que os hábitos e escolhas alimentares têm um impacto enorme no consumo de antocianinas.

A Dieta Mediterrânea (Figura 6) é caracterizada pela abundância de alimentos de origem vegetal, como o pão, massas, arroz, hortaliças, legumes, fruta fresca e frutos oleaginosos; utilização do azeite como principal fonte de gordura; consumo moderado de pescado, aves, laticínios e ovos; consumo de pequenas quantidades de carnes vermelhas e ingestão moderada de vinho, geralmente durante as refeições. A sua importância na saúde do indivíduo não se limita ao facto de se tratar de uma dieta equilibrada, variada e com nutrientes adequados. Aos benefícios de seu baixo teor de ácidos gordos saturados e alto teor de monoinsaturados, tal como em glícidos complexos e fibra alimentar, junta-se a riqueza em antioxidantes, determinantes para o bem-estar.

Por exemplo, uma dose de mirtilos aumenta o conteúdo em antocianinas da refeição total em mais de 500 mg, tal como a ingestão de uvas que providenciam entre 300 e

7500 mg de antocianinas. Os consumidores regulares de vinho e sumos também beneficiam em maior quantidade das antocianinas, uma vez que uma garrafa pode fornecer até 300 mg (Clifford 2000). À medida, que, como já foi referido, os consumidores se mostram mais preocupados com os efeitos dos corantes sintéticos na saúde, as indústrias apoiam-se no uso de antocianinas como substitutas do FD&C vermelho #40 (corante E129), o corante mais usado na indústria alimentar (He and Giusti 2010).

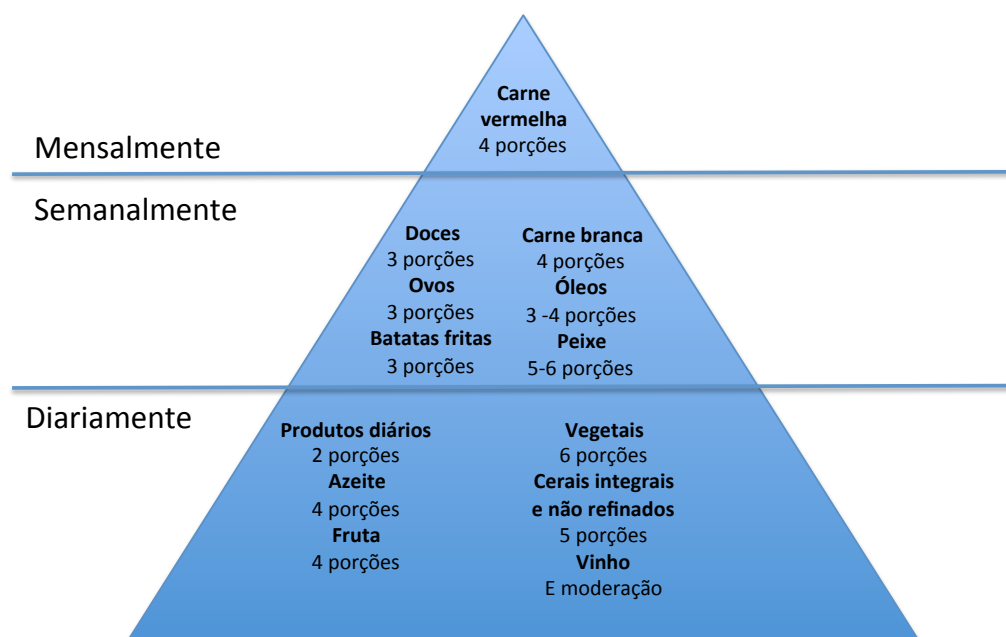


Figura 6. A dieta mediterrânica em pirâmide. Fonte: Conselho Científico de Saúde, Ministério da Saúde Helénico.

1.3.7. A toxicidade das antocianinas e as suas propriedades pro e antioxidantes

Os animais e os humanos consomem antocianinas desde tempos ancestrais. Nenhum efeito adverso na saúde foi reportado devido à ingestão de antocianinas (Brouillard 1982). O uso de antocianinas a partir de fontes naturais como corantes alimentares em bebidas e comidas (corante E136) é permitido dentro Europa, Japão e Estados Unidos, entre outros (Eder 2000). Baseado em estudos toxicológicos como avaliações de mutagenicidade, toxicidade reprodutiva e teratogenicidade (formação de teratomas, um tipo especializado de cancro), o Comité de especialistas em aditivos alimentares (FAO/WHO Expert Committee on Food

Additives - JECFA) composto pela Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO) e pela Organização Mundial de Saúde (World Health Organization – WHO), concluiu que o conteúdo de antocianinas dos vários extratos tinham toxicidade muito reduzida. O nível da observação do efeito para ratos foi determinado como sendo 222 mg/kg de peso corporal, e baseado neste resultado a dose diária recomendada de antocianinas por dia foi de 2,5 mg/kg de peso corporal (Clifford 2000).

O potencial antioxidante das antocianinas depende da estrutura química da molécula. Esta propriedade é influenciada por: o número de grupos hidroxilo; o grupo catechol no anel B; o íão oxónio no anel C; o padrão de hidroxilação e metilação; a acilação; e a glicosilação (Yang *et al.* 2011). A glicosilação das antocianinas diminui a sua capacidade antiradicalar quando comparadas com as suas aglicona, uma vez que é reduzida a habilidade das antocianinas para deslocalizar eletrões (Wang *et al.* 2008). A contribuição dos substituintes no anel B para a eficiência antioxidante é $\text{OH} > \text{OCH}_3 > \text{H}$ (Rosseto *et al.* 2007). Assim a eficiência antioxidante das principais antocianinas pode ser organizada da seguinte forma: $\text{dp} > \text{pt} > \text{mv} = \text{cy} > \text{pe} > \text{pg}$ (Rahman *et al.* 2006). Para além disso, a carga positiva no átomo de oxigénio do anel B torna a molécula num dador de prótons e antioxidante mais eficiente, quando comparado com proantocianidinas oligoméricas e outros flavonóides (Kong *et al.* 2003).

A atividade antioxidante das antocianinas pode ser potenciada por outros fitoquímicos que também são abundantes nos alimentos. Estes podem interagir mutuamente de uma forma sinérgica ou antagonista. Por exemplo, os flavonóides normalmente presentes na dieta participam em diversos efeitos antioxidantes sinérgicos com as antocianinas (Rosseto *et al.* 2002).

Determinados metabolitos de antocianinas como o ácido protocatechuico têm uma elevada bioacessibilidade e um efeito antioxidante marcado, podendo contribuir para efeitos benéficos (Vitaglione *et al.* 2007).

Os possíveis mecanismos através dos quais as antocianinas podem exercer os seus efeitos antioxidantes incluem vias diretas e indiretas. As antocianinas capacidade de sequestrar radicais diretamente devido à sua capacidade de doar prótons (Fukumoto *et al.* 2000), que se podem ligar às espécies reativas de oxigénio (ROS) como o anião superóxido, o singlete de oxigénio, o peróxido de hidrogénio, entre outros. A sobreprodução de ROS pode levar ao dano celular, que por sua vez pode levar ao desenvolvimento de diversas patologias associadas a alterações metabólicas como o cancro e doenças neurodegenerativas. Através de uma via

indireta, as antocianinas podem aumentar as defesas antioxidantes endógenas através de diversos mecanismos como: restauração ou aumento da atividade de diversas enzimas como a superóxido dismutase e a peroxidase da glutathione; ativação de genes que codificam as enzimas envolvidas na ação antioxidante endógena; e redução da formação de aductos de DNA, reduzindo a formação de ROS endógenas pela inibição da NADPH oxidase e da xantina oxidase ou pela modificação da respiração mitocondrial e do metabolismo do ácido araquidónico (Steffen *et al.* 2008).

Esta atividade antioxidante tem sido medida utilizando diferentes métodos. Um estudo em que foi usado o método de redução férrica, as antocianinas dp-3-glc, pt-3-glc e mv-3-glc mostraram ser mais antioxidantes que o ácido ascórbico em 2,5 vezes (Garcia-Alonso *et al.* 2004).

No entanto, com o uso de métodos como o Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) e Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), a capacidade antioxidante das antocianinas foi 3 a 6 vezes superior à do padrão Trolox. De acordo com estes dados, as antocianinas parecem ser melhores que os antioxidantes clássicos (Wang *et al.* 1997; Fukumoto *et al.* 2000, Narayan *et al.* 1999). Este efeito antioxidante potente está associado à presença de grupos hidroxilo no anel B. Recentemente, Bornsek e seus colaboradores (2012), demonstraram que as antocianinas dos mirtilos possuíam poderosos efeitos antioxidantes intracelulares em diferentes células de mamíferos, em concentrações muito baixas ($EC_{50} < 1\mu\text{g/L}$). Estas observações foram confirmadas por outro estudo em que a cy-3-glc, transportada via bilitranslocase, atuou como um antioxidante intracelular mostrando um EC_{50} (metade da concentração para atingir o efeito máximo) de 0,9 nM (Zibera *et al.* 2012). Estes estudos mostraram que as antocianinas são agentes antioxidantes ativos *in vivo*, apesar de a concentração no plasma após ingestão oral ser muito baixa.

As propriedades antioxidantes das antocianinas também foram demonstradas através de estudos *in vivo*, usando modelos animais. Ratos sujeitos a uma dieta rica em antocianinas mostraram uma atividade antioxidante superior no plasma em comparação com o controlo (Ramirez-Tortosa *et al.* 2001).

Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de antocianinas pode reduzir certos parâmetros do dano oxidativo (Weisel *et al.* 2006). Indivíduos que consumiram sumo de fruta rico em antocianinas mostraram ter um dano oxidativo no DNA reduzido (Weisel *et al.* 2006).

Apesar da extensa bibliografia que existe acerca das capacidades antioxidantes das antocianinas, estas, tal como já foi referido, podem também exercer efeitos prooxidantes à semelhança do que acontece com outros polifenóis em determinadas condições. A sua atividade prooxidante parece ser proporcional ao número de grupos hidroxilo (Cao *et al.* 1997). Estudos revelaram atividade prooxidante em flavonoides com diversos grupos hidroxilo como substituintes, sendo este efeito prooxidante associado à sua atividade antiproliferativa e proapoptótica (Hanasaki *et al.* 1994; Ueda *et al.* 2002).

Outras evidências sugerem ainda que a ligação insaturada C2-C3 e o grupo oxo na posição C4 podem promover a formação de ROS (Cao *et al.* 1997). Apesar da tendência de flavonoides que possuem múltiplos substituintes hidroxilo na sua constituição para causar danos celulares, é preciso ter em conta que no organismo estes compostos são sujeitos a alterações estruturais devido à ação metabólica, o que pode atenuar a sua reatividade *in vivo* (Heim *et al.* 2002).

1.3.8. As antocianinas na quimioprevenção e no combate ao cancro

As propriedades antitumorais das antocianinas que têm sido estabelecidas são principalmente baseadas em estudos *in vitro* e podem ser atribuídas a múltiplos mecanismos aditivos. Estes mecanismos incluem os seguintes: paragem do ciclo celular através do bloqueio das fases G1/G0 e G2/M; indução da apoptose e da antiangiogénese; inibição do dano oxidativo ao DNA; indução das enzimas de fase II para destoxificação; efeitos antimutagénicos; e inibição das enzimas COX-2. A atividade antiproliferativa das antocianinas ocorre em diferentes tipos de células *in vivo* (Zhao *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2005; Yi *et al.* 2006). Elas bloqueiam várias fases do ciclo celular através de efeitos na proteínas reguladoras do ciclo e inibindo seletivamente o crescimento de células tumorais, com nenhum efeito nas células normais. Por exemplo, extratos de antocianinas de uvas e amoras com uma concentração entre 25 e 75 µg/mL inibiram o crescimento de células tumorais do cancro do cólon, HT-29, no entanto este efeito já não foi verificado para as células do mesmo órgão não tumorais NCM460 (Zhao *et al.* 2004). O mecanismo envolvido nesta atividade seletiva não é conhecido. As antocianinas do vinho de mesa, por sua vez, parecem ser mais eficazes na inibição do crescimento de células tumorais HCT-15 (carcinoma intestinal) que outros flavonoides (Kamei *et al.* 1998).

Antocianinas isoladas de morangos reduziram a viabilidade celular de células tumorais da boca, cólon e próstata a uma concentração de 100 µg/mL, com

diferenças na sensibilidade de cada composto isolado (Zhang *et al.* 2008). A estrutura química das antocianinas individuais tais como, a aglicona e o padrão de glicosilação determinam os efeitos antiproliferativos (Zhang *et al.* 2005). De facto, as antocianidinas são inibidores mais eficazes da proliferação celular que as antocianinas, pelo bloqueio da ativação da via das MAP cinases (Zhang *et al.* 2005). A delphinidina mostrou ser a antocianidina mais eficaz na inibição do crescimento (Hou 2003). Num outro estudo foi demonstrado que tanto a delphinidina como a cianidina exerciam citotoxicidade em células tumorais do cancro coloretal (LoVo) através da inibição do sistema antioxidante da glutathione (Cvorovic *et al.* 2010). Foi também observado o efeito aditivo das antocianinas e outros polifenóis, onde a fração mais ativa contra as células tumorais foi a das antocianinas com proantocianidinas (Jing *et al.* 2008).

Os metabolitos das antocianinas também parecem exercer atividade antitumoral. De facto, Forester e seus colaboradores (2011), realizaram medições do efeito de vários metabolitos antociânicos na proliferação celular, citotoxicidade e apoptose na linha celular tumoral caco-2. Os metabolitos testados (ácido sirínico, ácido gálico, 3-O-metilgalhato e 2,4,6-triidroxibenzaldeído) mostraram uma toxicidade limitada, mas foi evidente a supressão da proliferação celular e a indução da apoptose a um concentração de 140 μ M. A atividade pode ser devida às suas características prooxidantes, libertando peróxido de hidrogénio, que pode por sua vez oxidar quaisquer enzimas presentes (Forester *et al.* 2011).

A apoptose desempenha um papel muito importante na eliminação das células tumorais e é induzida por agentes quimiopreventivos. As antocianinas causam apoptose nas células pré-malignas e malignas que causam efeitos proapoptóticos em múltiplas células *in vivo*, através de vias intrínsecas (como o aumento da libertação de citocromo c) e vias extrínsecas (como a modulação da expressão do FAS e do seu ligando). Podem funcionar com prooxidantes nas células tumorais promovendo a acumulação de ROS no seu interior (Feng *et al.* 2007).

As antocianinas também exibem propriedades anti-evasivas inibindo o processo de metastização. Este fenómeno ocorre com uma célula tumoral invade o tecido circundante e tecido distante promovendo o crescimento de novos tumores nesses locais. Para este processo ocorrer, tem que existir uma mobilidade quimiotática sinalizada por vários efetores. As antocianinas parecem ter um papel importante na inibição de múltiplos tipos de cancro através da redução da expressão de metaloproteinases (MMP) que têm um papel quimiotático essencial na formação de metástases (Brandstetter *et al.* 2001).

A angiogénese, consiste na formação de novos vasos sanguíneos e representa uma fase crucial na formação de tumores à distância. As antocianinas parecem suprimir este processo através de diversos mecanismos como: inibição de peróxido de hidrogénio e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); inibição da neovascularização; modulação da regulação do VEGF (Bagchi *et al.* 2004; Favot *et al.* 2003; Huang *et al.* 2006).

Vários estudos *in vivo* realizados com modelos animais e em humanos também evidenciaram o papel das antocianinas em várias fases do processo carcinogénico, como inibição da expressão de COX-2 (Lala *et al.* 2006) e associação da ingestão de antocianinas com a redução da incidência de cancro (Rossi *et al.* 2007; Bosetti *et al.* 2006; Duthie *et al.* 2006; Wang *et al.* 2007).

1.4. Biodisponibilidade

A ação terapêutica de um fármaco depende da existência de uma concentração efetiva deste no seu local de ação, durante um período de tempo desejável. Desta forma a disponibilidade ou biocinética de um composto (figura 7) a partir da forma farmacêutica assume um papel crítico na eficácia clínica de um medicamento, tornando-se por isso necessário caracterizar adequadamente o desempenho da formulação que o contém como medição adicional de eficácia. Uma vez que a concentração de um fármaco no local de ação se encontra em equilíbrio com a concentração do mesmo na corrente sanguínea, para a maioria dos fármacos a determinação das suas concentrações ao longo do tempo no sangue ou urina tornam-se medidas indiretas mas preditivas da concentração do mesmo fármaco no seu local de ação.

A biodisponibilidade é um termo farmacocinético definido pela fração de fármaco inalterado que atinge a circulação sistémica após administração por qualquer via. Descreve assim a velocidade e o grau com que a substância ativa é absorvida e fica disponível no local de ação.

A biodisponibilidade de um composto administrado por via intravenosa é considerada igual à unidade, enquanto que por via oral poderá ser inferior a 100% por duas razões principais: uma absorção incompleta e eliminação metabólica.

Após a administração oral de um determinado composto, este pode não ser totalmente absorvido em toda a sua extensão. Isto pode acontecer principalmente devido à falta de absorção no estômago. O termo absorção representa o transporte do composto desde o local de administração até à circulação sistêmica.

Depois de absorvido pelo trato gastrointestinal (assumindo a administração por via oral), o composto é transportado para o fígado antes de entrar em circulação sistêmica efetiva. O composto pode ser metabolizado no trato gastrointestinal, mas na grande maioria estes sofrem metabolização por parte do fígado antes de atingirem a circulação sistêmica. Adicionalmente, o fígado pode direcionar o composto para a bile. Qualquer uma destas ações provoca uma diminuição da biodisponibilidade do composto.

Após atingir efetivamente a circulação sistêmica os compostos são levados para os diferentes tecidos através de fenómenos quimiotáticos que determinam os locais onde estes vão ser reabsorvidos. Esta distribuição é essencial para que os compostos atinjam os tecidos alvo de forma a exercerem os seus efeitos. No entanto, é possível que já nestes locais sofram ainda novas alterações metabólicas. A ação conjunta da absorção, distribuição e eliminação vão ditar o potencial biológico do composto no organismo.

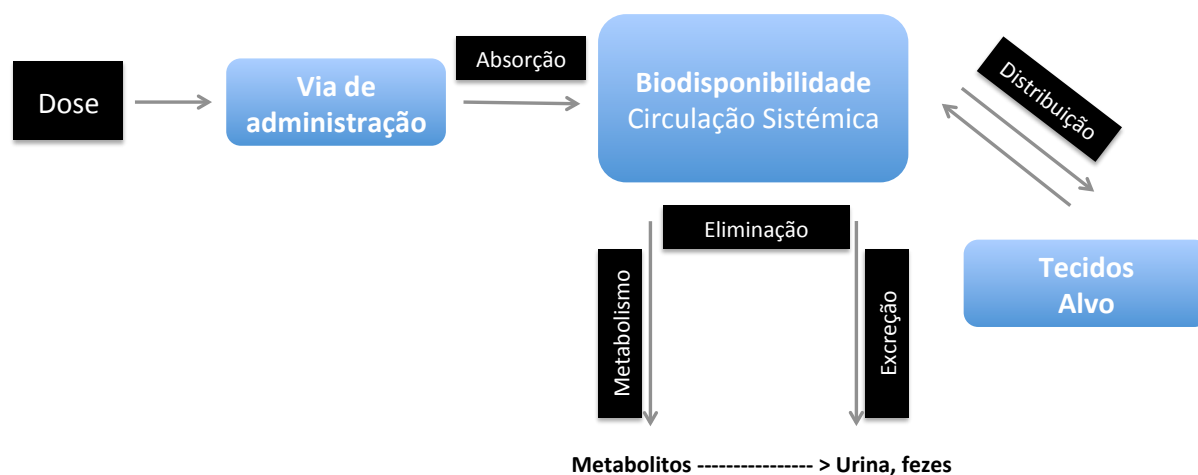


Figura 7. Diagrama simplificado da biocinética de um composto (adaptado de Byers *et al.* 2009)

1.4.1. A biodisponibilidade das antocianinas

Para validar os efeitos benéficos para a saúde reportados ao longo do tempo em diversos modelos *in vitro*, é importante considerar a biodisponibilidade das antocianinas *in vivo*. Este objetivo vai manter-se difícil de atingir dada a complexidade e diversidade estrutural das antocianinas e dos seus metabolitos originados pela ação metabólica do trato gastrointestinal e do fígado. Apesar disso, vários esforços têm sido feitos ao longo do tempo com resultados cada vez mais promissores.

No geral, os níveis de antocianinas detetados no plasma e na urina após ingestão de alimentos ricos nestes polifenóis são baixas (He *et al.* 2010).

As doses reportadas na maioria dos estudos *in vitro* têm pouca relevância para as condições *in vivo* uma vez que são muito superiores àquelas que serão estarão efetivamente presentes no tecidos, resultado das baixas concentrações de antocianinas intactas no sangue (Kroon *et al.* 2004). Outro facto importante é a forma dos metabolitos que estão presentes nos tecidos. Alguns metabolitos podem ter diferentes bioatividades dos seus precursores. Assim, para fazer uma avaliação correta da bioatividade das antocianinas, é crucial entender a sua biodisponibilidade. No que diz respeito às vias de absorção e vias metabólicas as antocianinas parecem diferir dos outros flavonoides uma vez que apenas glucósidos de antocianinas foram detetados intactos na urina e no plasma (Felgines *et al.* 2002). No entanto, métodos analíticos melhorados mostraram que as antocianinas sofrem também metilações, sulfonações e glucuronilações (Felgines *et al.* 2003, 2005, 2007; Kay *et al.* 2005; Wu *et al.* 2002).

A biocinética das antocianinas provenientes de diferentes fontes, em humanos, é apresentada na tabela 4. Estas fontes incluíram bebidas (vinho tinto e sumos de frutas), frutas e diferentes extratos de bagas e concentrados. Os valores apresentados incluem diversos parâmetros essenciais para a compreensão da biocinética destes compostos como: dose administrada, percentagem de recuperação urinária, concentração máxima no plasma ($C_{máx}$) e tempo para atingir a concentração máxima ($t_{máx}$). Os valores referem-se a antocianinas totais incluindo metabolitos, quando identificados.

Tabela 4. Biocinética das antocianinas em humanos após administração oral (adaptado de Faria *et al.* 2013). $C_{\text{máx}}$ – concentração máxima; $t_{\text{máx}}$ – tempo para atingir a concentração máxima; $t_{1/2}$ – tempo de semivida de eliminação.

Fonte	Dose antocianinas (mg)	Duração (h)	% Recuperação urinária	$C_{\text{máx}}$ (nmol/L)	$t_{\text{máx}}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)
Groselhas	95	3	0,79	4,64	3	-
Mirtilos	650	48	-	138	1,5	-
Sumo laranja vermelha	71	24	1,2	1,9	0,5	-
Bagas de airela	651	24	5,00	-	-	-
Bagas de aronia	721	24	0,15	96,1	2,8	1,5
Framboesa	431	7	0,16	-	-	-
Extrato de hibisco	147	7	0,018	7,6	1,5	2,6
Sumo uvas tintas	283	7	0,23	222,7	0,5	1,8
Vinho tinto	280	7	0,18	95,5	1,5	2,0
Groselha preta	3570	7	0,04	-	-	1,7
Bagas de sabugueiro		7	0,37			1,7
Bagas de aronia	1300	24	-	592	-	-
Vinho tinto	280	7	0,23	222,7	0,5	1,83
Sumo uvas tintas	283	7	0,18	95,5	1,5	1,58
Groselhas preta	345	7	0,029	-	-	-
Amora	189	7	0,064			
Mirtilos	439	7	0,020			
Morangos	77	24	1,9	-	-	-
Sumo de groselhas	1329	4	0,07	-	0,7	-
pretas	716	4	0,05		0,7	
Bagas de sabugueiro	1900	6	0,03	-	-	-
Mirtilos	1200	4	0,003	29,2	4,0	-

Mirtilos	690	6	0,004	-	-	-
Bagas de sabugueiro	720	24	0,08	97,4	1,2	-
Vinho tinto	68	6	6	1,4	0,3	
Vinho tinto sem álcool	56	6	6	1,7	1,5	-
Uvas tintas	117	6	6	2,8	3,0	
Bagas de sabugueiro	720	24	0,05	97,4	1,2	2,2
Groselhas pretas	236	8	0,11	60,0	1,5	3,0
Mistura de frutos silvestres	162	-	-	29,0	1,0	-
Vinho tinto	218	12	3,3	-	-	-

Fazendo uma comparação dos diferentes parâmetros é possível concluir que as antocianinas são absorvidas e eliminadas rapidamente. De facto vários estudos modelos animais indicam que as antocianinas aparecem na corrente sanguínea em pouco tempo (6 a 20 minutos) após o consumo e atingem a concentração máxima após 15 a 60 minutos (Matsumoto *et al.* 2001, 2005, 2006; Passamonti *et al.* 2003; Wu *et al.* 2004; Ichiyanagi *et al.* 2005, 2006; McGhie *et al.* 2007). Para além disso, os parâmetros mostram uma variabilidade considerável entre as diversas fontes de antocianinas.

Uma das evidências claras relativamente à absorção de antocianinas, é que esta é baixa, resultando numa biodisponibilidade limitada. No entanto esta pode estar subestimada por diversas razões. A estrutura química das antocianinas pode variar dependendo da fonte alimentar e do processamento a que foi sujeito, uma vez que o pH é altamente condicionante da estrutura da molécula; a dose administrada pode variar levando assim a uma maior ou menor quantidade absorvida que não está dependente da quantidade; os fenómenos fenotípicos e genotípicos; os métodos de análise e quantificação.

É importante ter em conta outro aspeto crucial para entender a biodisponibilidade das antocianinas. Tal como já foi referido, a natureza iónica destes compostos

permite-lhes adotar diferentes formas estruturais dependentes do pH da solução em que se encontram (Brouillard 1983). Apesar de serem mais estáveis a pH ácidos, estas têm necessariamente que percorrer locais no organismo com pH mais elevados, provocando uma alteração na sua forma estrutural. Esta alteração pode por sua vez comprometer os estudos sobre biodisponibilidade uma vez que a maioria deles são feitos com detecção UV-Vis tendo como base a conversão completa das várias formas químicas das antocianinas em catião flavílio, resultado da acidificação das soluções, principalmente para aumentar a estabilização e conservar as amostras. Isto faz com que seja inevitável que as outras formas sejam negligenciadas, transparecendo que apenas existe a forma de catião flavílio no organismo. No entanto, *in vivo*, as antocianinas encontram-se principalmente nas formas hemiacetal e/ou chalcona. Outra das razões que podem levar a uma quantificação subestimada é o facto de algumas espécies que existem a pH neutro não poderem ser convertidas em catião flavílio, resultado de diversas reações de conjugação com outras moléculas presentes no organismo.

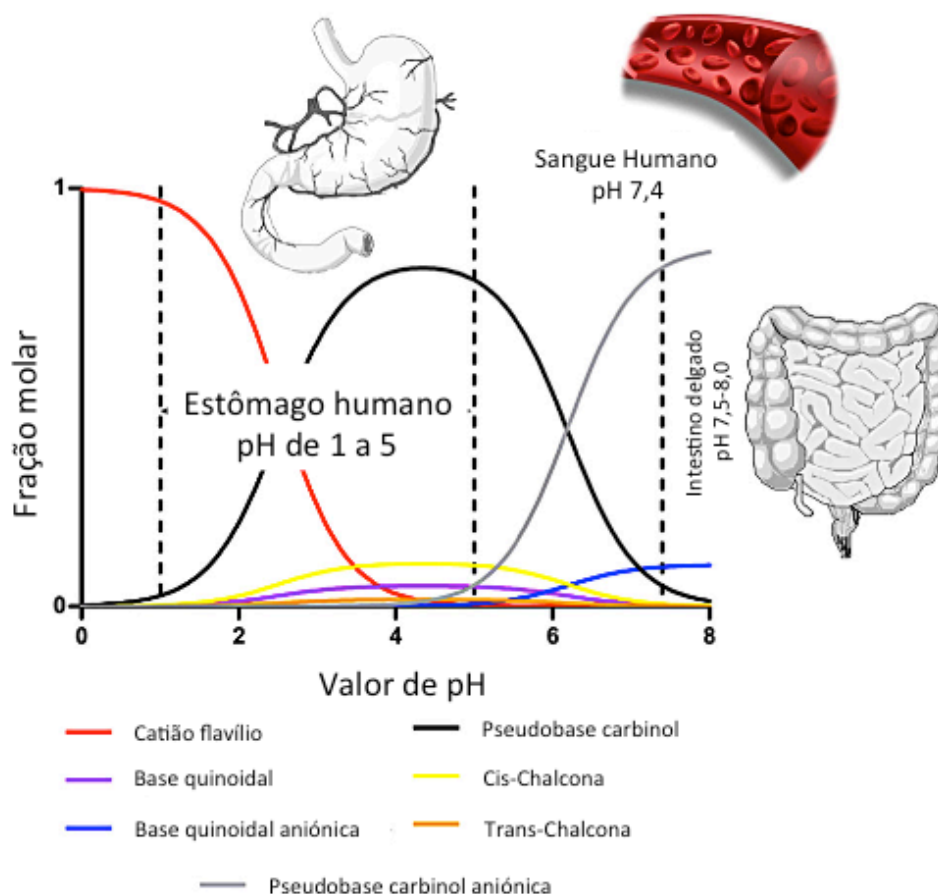


Figura 8. Efeito do pH no equilíbrio de antocianinas monoglucósido, não aciladas. Adaptado de Fernandes *et al.* 2014.

O efeito geral do pH no equilíbrio de uma antocianina monoglicósido não acilada está representado na Figura 8. Não são conhecidas com precisão todas as formas estruturais de antocianinas que ocorrem ao nível do trato gastrointestinal. A forma de catião flavílio deverá estar presente apenas ao nível do estômago, resultado do seu pH baixo, enquanto as outras formas predominam nas restantes zonas do trato gastrointestinal e nos tecidos.

É importante perceber que os flavonóides, apesar das características particulares que os distinguem, são tratados, pelos sistemas existentes no organismo como a maioria dos restantes compostos. Uma vez que estes fazem parte da dieta normal, pressupõe-se que sejam ingeridos principal por via oral. Assim, a sua biodisponibilidade está sujeita a diversos fatores, tal como acontece com outros xenobióticos.

Vários fatores fisiológicos reduzem a biodisponibilidade dos compostos mesmo antes da sua entrada na circulação sistémica. A própria refeição vai determinar se o composto é ou não absorvido.

A hidrofobicidade, a solubilidade e o pKa do compost também são fatores essenciais para determinar a sua absorção eficaz ou não. O mesmo se aplica às antocianinas.

As características estruturais também são importantes na determinação do êxito da absorção. Devido ao seu tamanho, as moléculas maiores podem ter a necessidade de ativar sistemas de transporte mais complexos, não conseguindo atravessar a membrane por difusão simples. Um composto hidrofílico, não tem tendência a atravessar membranas de uma forma livre, no entanto se for demasiado lipofílico, poderá não solubilizar eficientemente nas secrecies gástricas, dificultando a sua absorção uma vez que forma fases separadas na solução que se encontra no estômago. Adicionalmente, um composto com carga iónica não conseguirá atravessar membranas por difusão, podendo ser necessário outro tipo de processo para entrar na célula.

Vários fatores inerentes às características do trato gastrointestinal influenciam também a absorção dos diversos compostos, tais como o pH, a presença de alimentos, enzimas digestivas, ácidos biliares, microflora e a sua permeabilidade. A mobilidade gástrica e o tempo de escoamento podem influenciar a biodisponibilidade uma vez que um maior tempo de contacto estará, em princípio, associado a uma maior quantidade de composto absorvida.

No que se refere aos flavonóides, a estrutura química, o peso molecular, a glicosilação e a esterificação desempenham um papel essencial na biodisponibilidade destes compostos.

O peso molecular é um fator importante que afeta largamente a absorção, e consequentemente, a biodisponibilidade de certos flavonóides. Um exemplo são as proantocianidinas que, devido ao seu alto peso molecular, tornam a absorção praticamente impossível (Scalbert *et al.* 2002). As proantocianidinas não são absorvidas ao nível gástrico, em vez disso, atingem o colon, inalteradas, onde sofrem a ação das enzimas intestinais e da flora microbiana aí presente, sendo degradadas nos seus metabolitos que são posteriormente absorvidos para a circulação sistêmica ou excretados. E de facto estes metabolitos estão reportados como sendo biologicamente ativos (Scalbert *et al.* 2002).

A absorção dos flavonóides pode variar drasticamente tanto entre as diferentes classes de compostos como entre diferentes conjugados do mesmo composto de uma classe particular. A absorção de alguns glucósidos de flavonóides pode ser rápida, mas também pode ser muito lenta, e como tal afeta a biodisponibilidade. Por exemplo, um estudo mostrou que a biodisponibilidade de glucósidos de quercetina de maçãs foi apenas 30% daquela observada para cebolas (Hollman *et al.* 1997). Isto reporta para outro aspeto essencial que é matriz alimentar. O flavonóide tem de ser libertado da matriz em que está inserido e por outro lado a matriz pode influenciar a solubilidade do flavonóide. Por exemplo o etanol parece ter efeitos cruciais na absorção intestinal de antocianinas. O etanol pode aumentar a sua biodisponibilidade como foi demonstrado pelo aumento da captação de polifenóis do vinho tinto quando comparado com os níveis resultantes da ingestão de vinho tinto desalcoolidado (Scholz *et al.* 2007).

Foi reportado que glucósidos de quercetina foram absorvidos 10 vezes mais rápido e a concentração do plasma foi 20 vezes mais elevada quando comparados com rutinósidos de quercetina, em humanos (Hollman *et al.* 1999). Isto sugere que a glicosilação é também um fator importante para a biodisponibilidade dos flavonóides, e consequentemente, das antocianinas.

Apesar de as antocianinas serem rapidamente absorvidas, a sua biodisponibilidade é mais baixa que os restantes flavonóides (Walle 2004). Estes compostos não são facilmente hidrolisáveis nas suas formas aglicona. Apesar de a maioria dos flavonóides necessitarem de sofrer hidrólise para serem absorvidos, as antocianinas

são absorvidas e detetadas em circulação e ambas as formas glicosilada e não glicosilada.

Outro aspeto importante é a frequência de consumo. No caso das antocianinas a exposição crónica do epitélio intestinal a antocianinas favorece a sua absorção (Faria *et al.* 2009). Esta fundamentação está de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) que alerta para o consumo crónico de frutas e vegetais associado a um modo de vida saudável. Adicionalmente, outros fatores como idade, diferenças interindividuais e de género, o metabolismo e a ligação a proteínas podem acrescentar variação na absorção de compostos entre dois indivíduos distintos.

1.4.2. A absorção, distribuição, metabolismo e transporte de antocianinas nos diferentes tecidos

Tanto em humanos e animais, as antocianinas são absorvidas na sua forma intacta e circulam no plasma e passam para a urina sem sofrer alterações metabólicas (Morazzoni *et al.* 1991; Cao *et al.* 2001; Matsumoto *et al.* 2001 ; Mazza *et al.* 2002 ; Wu *et al.* 2002; Felgines *et al.* 2003, 2007). Na verdade, Bub e seus colaboradores (2001) não detetaram nem agliconas, nem conjugados glucuronados ou sulfatados no plasma e urina de humanos após o consumo de vinho tinto ou sumo de uva vermelha , que indica que a mv-3-glc é absorvida na sua forma glicosilada.

Estas características são consistentes com as observações de que as antocianinas são de facto absorvidas a partir do estômago (Passamonti *et al.* 2003; Talavera *et al.* 2003). Apesar de a absorção através da mucosa gástrica não ser usual, foi demonstrado que a administração de antocianinas atinge a circulação sistémica tanto a partir do intestino como a partir do estômago (Passamonti *et al.* 2003; Talavera *et al.* 2003). Por exemplo, em ratos, antocianinas como a mv-3-glc apareceram no plasma 6 minutos após administração *in situ* (Passamonti *et al.* 2003).

O intestino delgado é geralmente o local mais importante de absorção de nutrientes. As antocianinas podem também ser absorvidas pelo intestino de ratos e de seguida excretadas pela urina (Talavera *et al.* 2003).

A absorção intestinal das antocianinas é no geral, considerada baixa (Daayf and Lattanzio 2008), no entanto é preciso ter em atenção que vários fatores poderão estar envolvidos na complexidade envolvida neste fenómeno (Vanzo *et al.* 2008). Os processos físico-químicos que antecedem a absorção gastrointestinal, nomeadamente interação com proteínas dos alimentos ou com proteínas salivares e

enzimas digestivas (Matsui *et al.* 2001; Walle *et al.* 2005; Wiese *et al.* 2009) podem contribuir para essa reduzida biodisponibilidade a nível intestinal.

No trato gastrointestinal, a absorção de antocianinas foi maior no jejuno ($55,3 \pm 7,6$ %) e limitado a partir do duodeno ($10,4 \pm 7,6$ %) , enquanto que não houve absorção ao nível do íleo ou cólon (Matuschek *et al.* 2006) . Isto é consistente com outras observações, onde a absorção no intestino delgado chegou a 7,5 % de antocianinas ingeridas, o que é maior do que a biodisponibilidade observada anteriormente (Ele *et al.* 2009).

Kurilich e seus colaboradores (2005) sugeriram que as antocianinas absorvidas pelos humanos atingem uma dose máxima de 350 μ M devido à saturação dos mecanismos de absorção. Recentemente, um estudo cinético do transporte de antocianinas através da linha celular MKN-28 sugeriu o envolvimento de um mecanismo de transporte saturável na absorção de antocianinas (Fernandes *et al.* 2012).

Apesar da aparente reduzida biodisponibilidade, as concentrações plasmáticas das antocianinas parecem ser suficientes para induzir, *in vivo*, alterações em vias de transdução de sinal e expressão genética (Karlsen *et al.* 2007; DeFuria *et al.* 2009) o que está de acordo com o seu eventual papel nas funções fisiológicas e efeitos benéficos para a saúde.

Na Figura 9 apresenta-se uma representação esquemática resumida das vias de absorção e metabolismo das antocianinas.

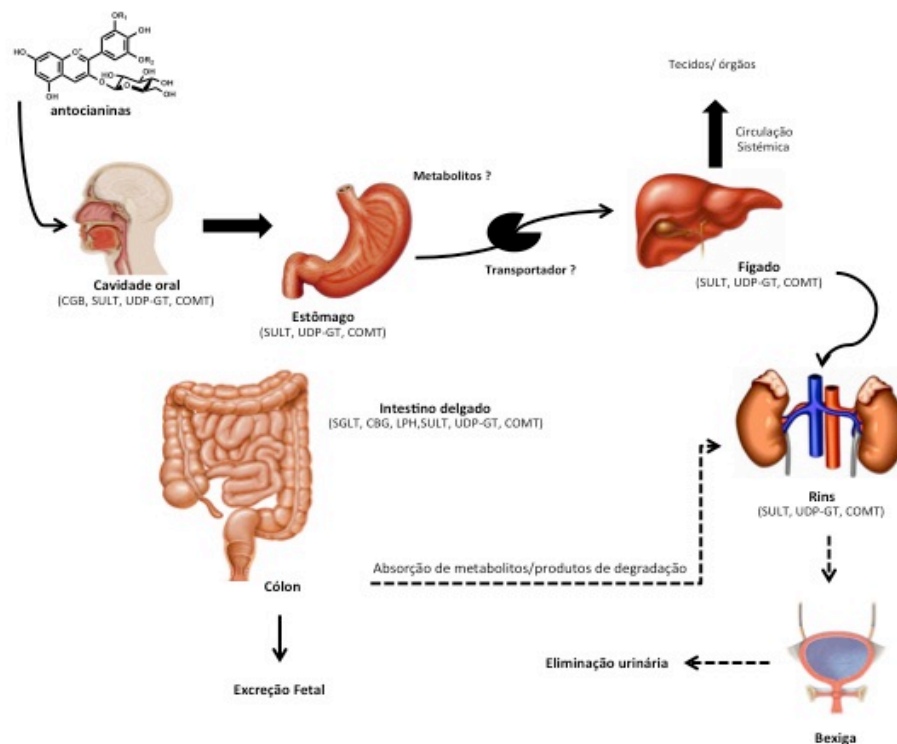


Figura 9. Vias de absorção de antocianinas. Adaptado de Fernandes *et al.* 2014.

Em ratos, as antocianinas parecem ser rapidamente retiradas do sangue para os tecidos, onde se acumulam e exercem as suas atividades biológicas (Vanzo *et al.* 2011), apesar de a sua biodisponibilidade nos tecidos parecer limitada. Estes compostos podem ser absorvidos em diversos tecidos como o cérebro e os rins (Kalt *et al.* 2008; Marczylo *et al.* 2009). Podem também ser absorvidos pelas células endoteliais vasculares humanas. Um estudo recente mostrou a absorção de cy-3-glc ocorre através do transportador da bilitranslocase. A cy-3-glc entra na célula 1 minuto após a sua aplicação. Adicionalmente, na linha celular endotelial testada, esta antocianina sofre metilação intracelular formando pe-3-glc e este composto move-se através da membrana no sentido oposto. A deteção de pe-3-glc no meio de cultura oferece-se evidências indiretas de que o seu precursor é absorvido para dentro das células (Zibera *et al.* 2012).

Alguns estudos investigaram a absorção de antocianinas no fígado. Sakakibara e seus colaboradores (2009) examinaram a distribuição de antocianinas em ratos sujeitos a uma dieta rica em antocianinas. Foi estimado que 51,5% das antocianinas

no organismo estavam localizadas no fígado, sugerindo que este órgão pode ser um alvo de acumulação destes polifenóis.

Outro local importante na distribuição das antocianinas é o cérebro. As antocianinas possuem a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica e exercer atividade biológica ao nível do cérebro. Passamonti e seus colaboradores (2005) verificaram que antocianinas de uvas estavam presentes no cérebro de ratinhos apenas 10 minutos após a administração. Isto demonstra a movimentação rápida e seletiva das antocianinas desde o estômago até ao cérebro. Andres-Lacueva e seus colaboradores (2005) identificaram várias antocianinas em diferentes zonas cerebrais.

Os rins são também um alvo das antocianinas, Vanzo e seus colaboradores (2008) observaram que antocianinas de uvas administradas no estômago de ratos anestesiados apareceram no tecido renal 10 minutos após a administração. As antocianinas sofrem ações metabólicas nas células tubulares dos rins como o envolvimento da COMT. As antocianinas metiladas são acumuladas nos rins de ratos e podem também ser transportadas de novo para fora das células por meio da bilitranslocase, que é um transportador bidirecional (Vanzo, 2008).

Uma vez na corrente sanguínea, as antocianinas que são absorvidas podem sofrer algumas formas de metabolização intracelular. Os intermediários reativos produzidos durante a fase I sofrem posteriormente conjugação (com grupos tiol, em particular com a glutathione reduzida (GSH), com ácido glucurónico ou grupos sulfato) e metilação (Figura 10). As reações dos metabolitos com enzimas da fase II, fígado promovem a fase de destoxificação. Estas enzimas também estão presentes no epitélio intestinal e nos rins. Através destas vias, as antocianinas sofrem biotransformações incluindo metilação, glucuronilação e sulfatação. As enzimas envolvidas incluem a COMT, a uridina difosfoglucose glucuronosil transferase, fenol sulfotransferase (SULT1), entre outras.

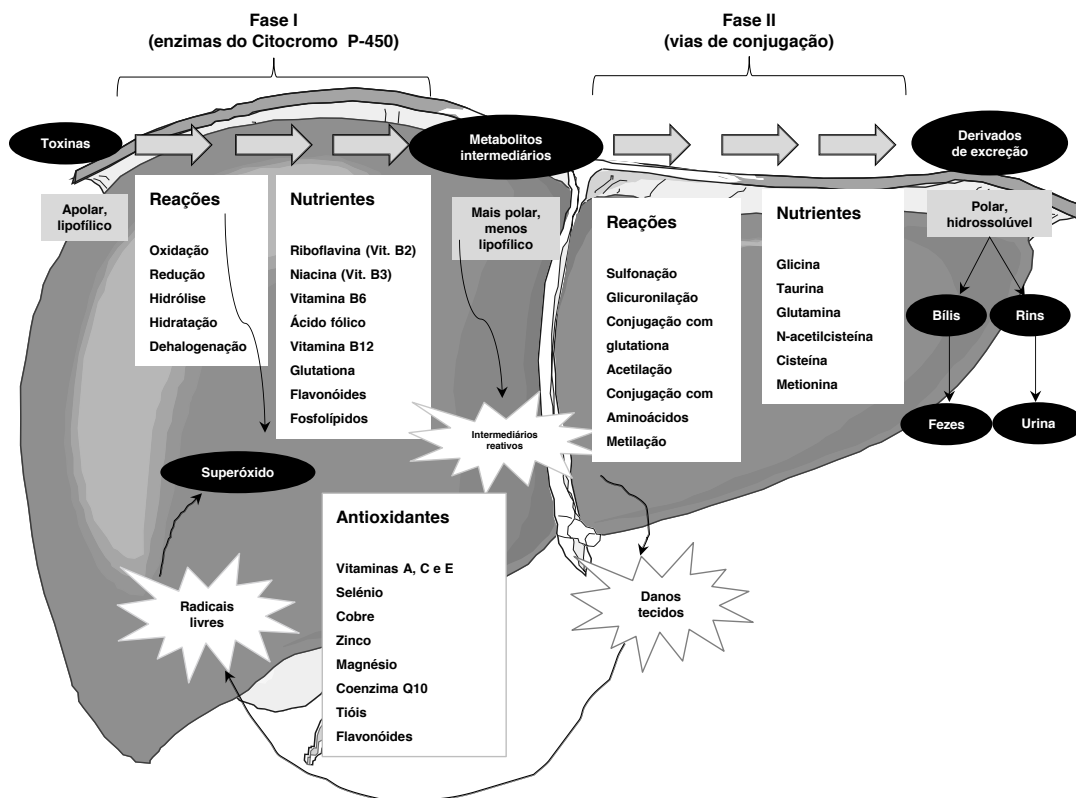


Figura 10. Vias hepáticas de detoxificação. Adaptado de Lyska *et al.* 2006.

O cotransportador glicose/sódio (SGLT1) e a lactase (LPH) parecem estar envolvidos na absorção de quercetina-glicosilada no intestino delgado e a sua atividade é inibida na presença de glicose ou floridzina (Hollman *et al.* 1999).

Em estudos *in vitro*, existem evidências que a absorção de alguns flavonóides glicosilados inclua a interação com o SGLT1 (Gee *et al.* 1998; Gee *et al.* 2000). Alguns autores sugerem que as antocianidinas glicosiladas podem, em parte, ser absorvidas por um mecanismo semelhante ao anteriormente descrito (Clifford 2000; Mulleder *et al.* 2002). Outros autores defendem que a interação com o SGLT1, não comprova necessariamente que exista a interação entre as antocianinas e a enzima com o consequente transporte. Os glicósidos fenólicos podem interagir com o transportador impedindo o transporte de oses, mas não serem transportados, possivelmente como resultado do volume elevado das agliconas ligadas à glicose (Day *et al.* 2000).

OBJETIVOS

Neste trabalho, pretendeu-se avaliar o transporte de antocianinas num modelo de barreira gástrica recentemente desenvolvido com a linha celular do adenocarcinoma gástrico MKN-28.

Para isso, foram realizados estudos de transporte transepitelial nos quais foram avaliados a influência de diversos fatores:

- Etanol, glucose, pH e exposição crónica a antocianinas.

Foi também feito o desenvolvimento de um método de análise quantitativa e qualitativa de antocianinas por *Ultra High Pressure Liquid Chromatography* (uHPLC) para avaliar os resultados obtidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e Suportes

Gel TSK Toyopearl HW-40S (Tokyo, Japan); Gel sílica 100 C18 fase reserva (Fluka, Switzerland); Soro fetal de bovino (Sigma-Aldrich-Madrid, Spain); EDTA-Tripsina 0,25% (Sigma-Aldrich-Madrid, Spain); Solução de fosfato tamponada (Sigma-Aldrich-Madrid, Spain), meio RPMI-1640 AQMedia (Sigma-Aldrich-Madrid), Ácido Clorídrico; Acetonitrilo; Ácido fórmico; Dimetilsulfóxido 99% pureza (Fluka, Switzerland); Etanol; D(+)- Glucose (Sigma-Aldrich); meio Hanks (Sigma-Aldrich-Madrid, Spain); 2-(N)-ácido morfolinoetanosulfónico (MES) (Sigma-Aldrich-Madrid, Spain).

Tubos Falcon de 15 mL e 40 mL (TPP, Switzerland); pipetas de 5 e 10 mL (TPP, Switzerland); placas de cultura 60 x 15 mm (TPP, Switzerland); microscópio Motic AEZI, 101M; uHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, USA); HPLC, placas de crescimento *Transwell*® com 12 inserts de membrana de policarbonato, poro com 0,4 µm e 12 mm de diâmetro (Corning Star, The Netherlands).

3.2. Obtenção do extrato de antocianinas

Para a obtenção dos extratos, foi necessário fazer a extração do etanol presente num volume total de 200 mL de cada vinho, através de evaporação rotativa a 30°C. Posteriormente, realizou-se uma filtração em gel de sílica C-18 de fase reversa, com o objetivo de eliminar os açúcares presentes na amostra, tendo sido utilizados metanol e água destilada, ambos acidulados (HCl 2%), para lavagem e condicionamento do gel, respetivamente. A remoção do metanol e concentração da amostra foi realizada por uma nova evaporação rotativa a 30°C. As soluções obtidas foram liofilizadas e conservadas a -20°C.

3.3. Caracterização por análise cromatográfica em HPLC e uHPLC

Para analisar o extrato de vinho de mesa original, utilizou-se a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A deteção das antocianinas no extrato de vinho por HPLC foi realizada utilizando um detetor Spectra System UV8000 com uma coluna C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm) (Thermo Scientific). Os solventes utilizados foram: solvente A – água/ ácido fórmico (90:10) e solvente B – água/ácido fórmico/acetonitrilo (60:30:10). A eluição ocorreu a um fluxo de 1,0

mL/min e o gradiente de eluição foi: 80%-15% de solvente A dos 0 min aos 70 min. A lavagem da coluna ocorreu durante 20 minutos com 100% de solvente B, tendo sido de seguida estabelecidas as condições iniciais. A detecção ocorreu a 520 nm.

Para analisar os resultados obtidos ao longo do trabalho, foi utilizado o método de ultra cromatografia líquida (uHPLC). A detecção das antocianinas foi realizada utilizando um uHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) com uma coluna Hypersil GOLD 5 cm (1,9 μ m de diâmetro interno). Os solventes utilizados foram: solvente A – água/ ácido fórmico (95:5) e solvente B – acetonitrilo 100%. A eluição ocorreu a um fluxo de 0,5 mL/min e o gradiente de eluição foi o seguinte: 0 – 7 minutos: 94,5% A – 64% A; 7 – 10 minutos: 64% A – 20% A; 10 – 10,1 minuto: 20% A – 0% A; 10,1 – 12 minutos: 100% B isocrático; 12 – 15 minutos: 94,5% A e 5,5% B isocrático. A detecção ocorreu a um comprimento de onda de 520 nm.

3.4. Culturas celulares

A linha celular tumoral MKN-28 originária de epitélio gástrico humano foi gentilmente cedida pelo Professor Doutor Celso Reis do IPATIMUP (Porto, Portugal) tendo inicialmente sido adquirida à Cell Bank, Riken BioResource Center (JCRB0253, Ibaraki, Japan). As células cresceram em monocamada tendo sido mantida em frascos de cultura celular de 25 cm² com 5 mL de meio de cultura. O meio de cultura foi feito com RPMI- 1640 AQMedia, suplementado com 10 % de SFB inativado (por aquecimento durante 1 h a 56 °C em banho de água), 100 unidades/mL de penicilina e 100 μ g/mL estreptomicina e 0,25 μ g/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha).

O meio de cultura foi renovado a intervalos de 48 h e as células atingiram a confluência ao fim de 5-6 dias de cultura. Para a manutenção da divisão das células em cultura, estas foram dissociadas com 0,25 % de tripsina-EDTA, diluídas a 1:3 e cultivadas em placas de petri com 21 cm² de área de crescimento (Corning Costar, Badhoevedorp, The Netherlands). Para as experiências de transporte transepitelial as células foram semeadas em inserts (membrana de policarbonato, poro com 0,4 μ m, 12 mm de diâmetro, Corning Costar, Badhoevedorp, The Netherlands). Os inserts foram colocados em placas de 12 poços nas quais cresceram durante 7 dias.

A resistência eléctrica transepitelial (TEER) das células foi medida utilizando um voltímetro epitelial com eléctrodos planos (Millipore Co., Bedford, MA). As experiências foram efetuadas em monocamadas com TEER > 150 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. A TEER foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$TEER(\Omega \cdot \text{cm}^2) = \text{resistência} \times \text{área do filtro}(\text{cm}^2)$$

3.5. Avaliação da viabilidade celular

Células da linha MKN-28 foram cultivadas em placas de *Transwell*® durante 7 dias até atingirem o estado de confluência. De seguida foram sujeitas à exposição a uma gama de concentrações crescentes de etanol durante 3 horas (0%, 1%, 2% e 4%).

A viabilidade celular foi avaliada com o corante vital, azul de tripano. Após tripsinização foi determinado, em todas as suspensões celulares, o número total de células viáveis tendo-se para tal adicionado a 50 μL de suspensão celular, 50 μL de azul de tripano e procedido à contagem, em câmara de Neubauer, das células que apresentaram capacidade de excluir o azul de tripano (incolores) que corresponderam às células viáveis. O número de células viáveis foi dado por % de viabilidade usando a seguinte equação:

$$\% \text{viabilidade} = 100\% - \left(\frac{n^\circ \text{ células coradas}}{n^\circ \text{ células total}} \times 100 \right)$$

3.6. Ajuste do pH apical

Nos estudos de transporte o lado basolateral continha meio Hanks (Sigma-Aldrich-Madrid, Spain) pH 7,4 com 2 % SFB. O pH do lado apical foi ajustado de forma a mimetizar as condições ácidas do estômago, de acordo com Fernandes e colaboradores (Fernandes *et al.* 2012). O pH 5,0 foi conseguido por adição de 2-(N)-ácido morfolinoetanosulfónico (25 mM) e posterior ajuste do pH ao valor desejado com HCl (5 M).

3.7. Estudos de Transporte

Os estudos de transporte (figura 11) foram realizados de acordo com um procedimento descrito na literatura (Fernandes *et al.* 2012). Removeu-se o meio de cultura e lavaram-se as células com meio Hanks pH 7,4 no lado basolateral e com meio Hanks pH 5,0 ou 7,4 no lado apical. A solução de antocianinas (em meio Hanks pH 5,0 ou 7,4; 100 μ M) foi adicionada ao lado apical das células e Hanks com 2 % de SFB foi adicionado ao compartimento basolateral. O transporte transepitelial foi seguido em função do tempo, a 37 °C. Recolheram-se alíquotas (150 μ L) do lado basolateral e repôs-se o volume com meio Hanks aos 30, 60, 120 e 180 min. As amostras foram acidificadas com HCl (0,06 M) e congeladas (-18 °C) por forma a garantir que a quantidade cumulativa de cada composto não sofria alteração até análise por uHPLC (de acordo com o procedimento descrito acima). As antocianinas foram quantificadas utilizando a seguinte curva de calibração:

Curva calibração Mv3glc (μ M): Concentração = $9,785 \times \text{área}$ ($R^2 = 0,9993$), $\lambda = 520$ nm.

A eficiência de transporte foi calculada de acordo com a seguinte equação: (concentração de composto no lado basolateral a um determinado tempo/concentração de composto no lado apical ao tempo 0) x 100.

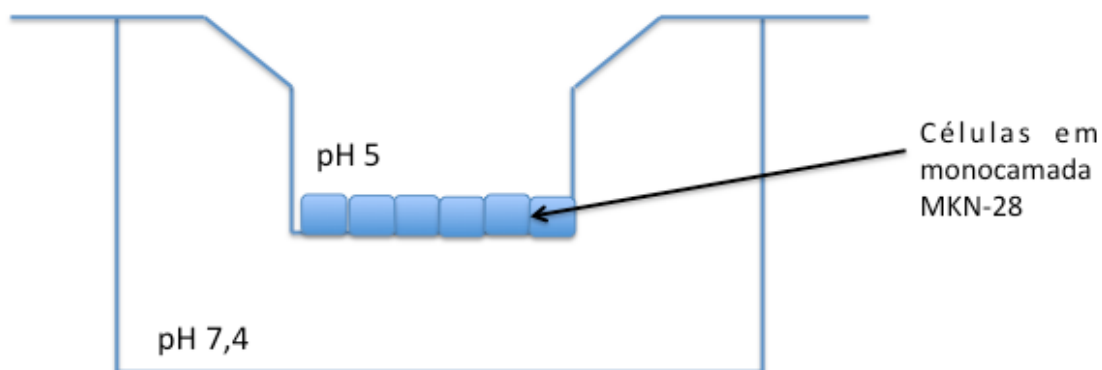


Figura 11. Esquema representativo da placa de *Transwell*®.

3.7.1. Estudos do efeito do etanol, glucose, pH e exposição prévia a antocianinas no transporte.

Para os estudos com etanol, foram utilizadas duas soluções de antocianinas (100 μ M) com concentrações de 0% e 4% em Etanol.

Para os estudos com glucose, foram utilizadas diferentes soluções de antocianinas (100 μ M) com várias concentrações de glucose (0, 20, 40, 60, 80, 100, 250 e 500 mM).

No estudo de pH, este foi acertado para cada uma das soluções de antocianinas (100 μ M) (pH 5) com meio MES.

Para o estudo do efeito da exposição prévia a antocianinas metade dos *inserts* da placa de *Transwell*® foram sujeitos à exposição de uma solução de antocianinas (100 μ M) a cada 48 horas (dois dias após o plaqueamento das células e dois após a primeira exposição).

Todos os procedimentos anteriores foram realizados de acordo com o ponto 3.7.

3.8. Análise Estatística

Todas as experiências foram efetuadas pelo menos em triplicado. Os valores estão expressos como médias aritméticas \pm erro padrão médio (EPM). As diferenças estatísticas foram avaliadas através da análise de variância a um fator (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, utilizando o software GraphPadPrism v5. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A permeabilidade gastrointestinal de fármacos e nutrientes é geralmente avaliada através do uso de modelos bem estabelecidos de barreira intestinal. Isto faz com que a absorção a outros níveis seja desprezada, como por exemplo no estômago. De facto, até muito recentemente pouca atenção tinha sido atribuída à absorção gástrica de componentes alimentares com exceção do etanol (Hogben *et al.* 1957). Os estudos que começaram a surgir (Passamonti *et al.* 2002; Kavvada *et al.* 2005; Felgines *et al.* 2009; Cao *et al.* 2002) ainda são muito pouco reveladores de todo o potencial de absorção gástrico, sendo necessário um estudo mais aprofundado e novas perspetivas de análise.

É com este epitélio que os componentes ingeridos por via oral entram em contacto em primeiro lugar permanecendo mais tempo, resultado dos fenómenos digestivos. A quantidade absorvida depende de vários fatores, mas principalmente da solubilidade do composto nas condições gástricas, do tempo que o composto permanece na cavidade gástrica e do volume. O tempo de permanência após uma refeição pode chegar às 3-4 h. O estômago está revestido por um epitélio colunar muito heterogéneo e com uma geometria morfológica bastante complexa, o que dificulta a análise das funções de transporte a este nível. Para além disto, os procedimentos metodológicos, em termos gerais, para isolar e trabalhar com culturas primárias de células gástricas são consideravelmente mais difíceis do que os métodos aplicados a células tumorais humanas de estômago, para efetuar estudos de transporte.

A absorção de antocianinas é um assunto de extrema importância uma vez que estes compostos representam componentes importantes da dieta para consumidores que ingerem frutos vermelhos e vinho tinto como base da sua alimentação, e estão descritas propriedades benéficas para a saúde relacionadas com o seu consumo (Prior and Wu 2006). Diversos estudos, *in vivo* e *in vitro*, têm associado o consumo de antocianinas e alimentos ricos em antocianinas a efeitos benéficos para a saúde, nomeadamente ao nível da melhoria de capacidades cognitivas e memória, inibição da proliferação celular tumoral e indução da apoptose de células tumorais e inibição de acumulação de gordura (Ren *et al.* 2003; Andres-Lacueva *et al.* 2005; Rayalam *et al.* 2008; Spencer 2009). No entanto, a questão específica da biodisponibilidade destes compostos ainda continua por esclarecer. Trabalhar com modelos animais e humanos é, obviamente um importante veículo para obter novas informações acerca da biodisponibilidade de antocianinas. No entanto, têm sido desenvolvidos diversos modelos que se mostraram extremamente úteis, como por exemplo o modelo de barreira intestinal usando a linha celular caco-2. Os métodos disponíveis para avaliar a absorção de drogas ao nível gástrico,

fazem uso de células gástricas epiteliais isoladas, que são morosos e difíceis de trabalhar. Uma exigência crítica para estes modelos é trabalhar a pH reduzido. Assim, um trabalho recentemente publicado, reporta o desenvolvimento de um modelo *in vitro* com células do adenocarcinoma de estômago (MKN-28) (Fernandes *et al.* 2012). Através do uso deste modelo é possível trabalhar a diferentes condições de pH que correspondem ao estado alimentado e não alimentado, pH 3 e pH 5, respetivamente. Foi a partir deste modelo que se basearam todos os estudos realizado neste trabalho.

Neste estudo realizaram-se diferentes ensaios de transporte de antocianinas ao nível gástrico utilizando a linha celular tumoral humana MKN-28 (adenocarcinoma gástrico), onde foram testadas diversas variáveis como a influência o etanol, da glucose, da exposição crónica a antocianinas, influência do pH. Foi realizada também a otimização de um método de análise de antocianinas por uHPLC para se poder proceder à interpretação dos resultados obtidos nos estudos experimentais.

4.1. Variação da resistência elétrica transepitelial das células MKN-28

Os sistemas biológicos utilizados em estudos *in vitro*, são, geralmente, sistemas extremamente sensíveis a fatores externos. No caso de estudo de transporte, é necessário que determinadas condições sejam estabelecidas, nomeadamente, a obtenção de um estado de confluência por parte das células onde se dá a formação de junções apertadas que permitem mimetizar *in vitro* o tecido epitelial *in vivo*. À medida que a monocamada de células se vai formando e atingindo o estado de confluência, a sua resistência elétrica transepitelial (TEER) vai aumentando. Quando as junções apertadas estão completamente formadas e as células mimetizam um tecido confluyente, os seus valores de TEER vão-se mantendo constantes ao longo do tempo. Assim, para uma otimização das condições de cultura, as células foram semeadas em *inserts* (membrana de policarbonato, poro com 0,4 µm, 12 mm de diâmetro) de placa de *Transwell*®. A resistência elétrica transepitelial das células foi medida a 37° C, em meio Hanks pH 7,4 ao longo dos vários dias de crescimento, tendo-se observado um crescimento contínuo dos valores de TEER, o que sugere a formação das junções apertadas (figura 12). Verifica-se também que do sexto para o sétimo dia os valores de TEER verifica-se o aparecimento de um plateau no gráfico, o que sugere que os valores de TEER não são significativamente diferentes

sustentando a hipótese da monocamada ter atingido a confluência e estar assim preparada para ser utilizada em estudos de transporte.

Assim, é possível afirmar que ao fim de 7 dias, à temperatura normal do corpo humano (37° C), a monocamada de células do adenocarcinoma gástrico MKN-28 atingiu a confluência e encontra-se nas condições exigidas para se efetuarem os estudos de transporte.

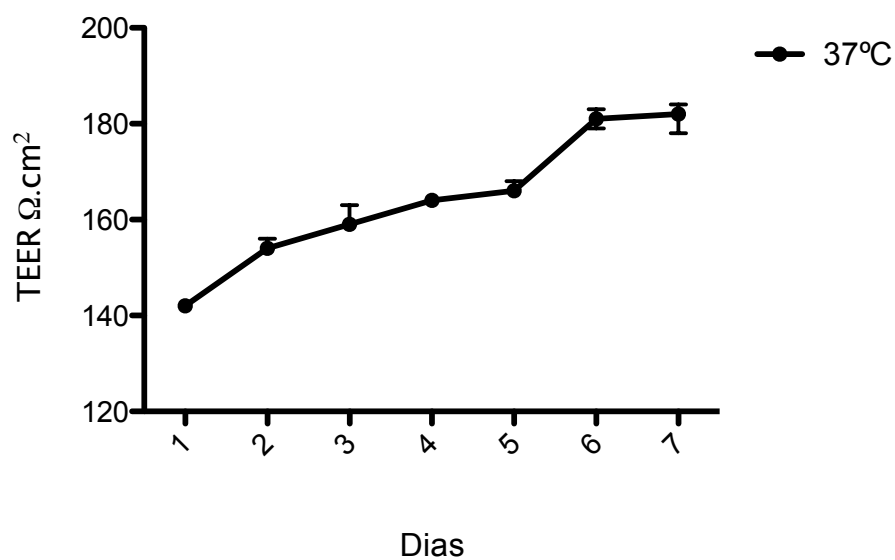


Figura 12. Variação da resistência elétrica transepitelial (TEER) ao longo de 7 dias de cultura, à temperatura de 37° C. (n=6).

4.2. Influência do Etanol e do Dimetilsulfóxido na resistência elétrica transepitelial das células MKN-28

O primeiro passo neste estudo foi a obtenção de um extrato de antocianinas a partir de um vinho de mesa, cujo perfil cromatográfico está representado nas figuras 21 e 24. Para isso, foi necessário, tal como descrito na secção de Material e Métodos, proceder à eliminação dos açúcares e do álcool presentes no vinho. Muito sucintamente, passou-se por gel C-18 fase reversa 200 mL de uma amostra de vinho de mesa, previamente sujeita a evaporação rotativa, para eliminação do etanol e de seguida aplicou-se água acidulada para compactação do gel e extração dos açúcares, por fim aplicou-se metanol acidulado para obtenção do extrato de antocianinas sendo, de seguida, sujeito mais uma vez a evaporação rotativa e liofilizado. Numa fase posterior o vinho liofilizado foi dissolvido em água a uma concentração conhecida obtendo-se um stock com uma concentração de 100 mg/mL. No entanto, foi necessário adicionar 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) para garantir uma dissolução completa do liofilizado, originando uma solução homogénea. O DMSO está descrito como sendo prejudicial para as células em determinadas concentrações, afetando a permeabilidade membranar e o material genético (Santos *et al.* 2003). Nas condições utilizadas nos estudos de transporte, as células ficam sujeitas a uma percentagem de máxima de DMSO de 0,025%, uma vez que é aplicada uma concentração de 0,5 mg/mL da solução stock de vinho. Assim, numa perspetiva de proteção celular durante os estudos de biodisponibilidade, de modo a garantir a reprodutibilidade dos mesmos nas condições exigidas, procedeu-se ao estudo do efeito desta concentração de DMSO nas células MKN-28. O modelo do estudo consistiu em deixar as células crescer durante 7 dias em placas de *Transwell*® e de seguida aplicar uma solução de água com 0,025% de DMSO durante 3h (tempo utilizado nos ensaios de transporte). Foi medida a TEER antes da aplicação e ao final das 3 horas. Numa mesma perspetiva, foi também testado o efeito do etanol, um dos componentes do vinho de mesa, usando uma percentagem de 4% etanol.

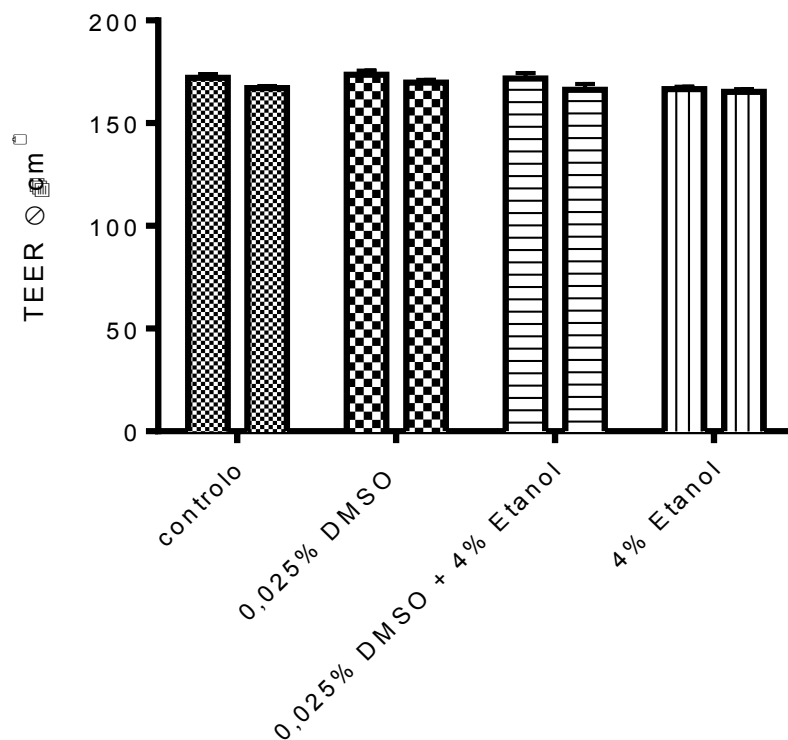


Figura 13. Variação da resistência elétrica transepitelial (TEER) antes da aplicação (colunas da esquerda) e ao fim de 3 horas (colunas da direita) de DMSO e etanol, (n=6)

Como se pode verificar pela figura 13, todas as hipóteses testadas não mostraram diferenças significativas na variação da TEER ao longo das 3 horas. Isto é indicativo de uma resistência por parte desta linha celular às concentrações de DMSO e etanol testadas. Verifica-se, em todos os casos analisados, que a TEER decresceu ligeiramente comparativamente com o valor inicial. No entanto, esta observação pode ser desprezada pois é muito provável que decorra da normal atividade metabólica das células aquando da sua ativação por parte das variantes externas às quais foram expostas. Assim, observando as colunas correspondentes à solução de água sem nenhuma das variantes e as colunas correspondentes à solução com cada uma delas isoladas, pode-se afirmar que nem o etanol nem o DMSO têm qualquer efeito negativo na resistência elétrica transepitelial, o que é sugestivo de uma manutenção das junções apertadas em monocamada, condição necessária para realizar os estudos de transporte de forma precisa. Analisando a coluna correspondente à solução com, simultaneamente, DMSO e etanol, e comparando

com as restantes, é possível também concluir que parece não existir qualquer tipo de efeito sinérgico entre estas variantes.

4.3. Viabilidade celular da linha MKN-28 sujeita a diferentes concentrações de etanol

A resistência elétrica transepitelial é um bom indicativo do estado de uma cultura celular em monocamada. No entanto, é necessário também garantir que a viabilidade das células se mantém num nível elevado pois num tecido, as células podem não estar viáveis e possivelmente formarem a parede juntamente com as outras. Para garantir que a percentagem de etanol usada anteriormente no ensaio da TEER (figura 13) não afeta também a viabilidade celular, foi realizado um estudo com azul de tripano.

O azul de tripano é um corante usado para distinguir células ou tecidos viáveis dos não viáveis. As células vivas ou os tecidos intactos não são corados, uma vez que a seletividade da membrana celular não permite a passagem do corante. Nas células mortas, o corante atravessa a membrana celular e provoca uma coloração azul. Assim, as células não viáveis são evidenciadas através da coloração azul que o corante lhes atribui.

O procedimento usado esteve de acordo com o descrito na secção de Materiais e Métodos. Foi feita uma adição de 50 mL de corante azul de tripano a 50 mL de suspensão celular de cada poço. Foi feita a contagem das células viáveis ao microscópio em câmara de Neubauer. A percentagem de viabilidade foi determinada pela equação matemática representada na figura 14.

$$\%viabilidade = 100\% - \left(\frac{n^{\circ} \text{ células coradas}}{n^{\circ} \text{ células total}} \times 100 \right)$$

Figura 14. Expressão matemática representativa do cálculo da viabilidade celular da linha MKN-28.

Através da figura 15, podemos retirar várias observações relativas ao efeito do etanol na viabilidade das células. Para a valor de 0% e 1% de etanol, a percentagem de células viáveis ao fim de 3 horas foi de 99,85% e de 99,69%, respetivamente.

Para o caso em que foi aplicada uma solução com 2% de etanol a viabilidade das células chegou aos 98,36%. Neste caso, verifica-se um decréscimo superior a um valor percentual relativamente à ausência de etanol. Isto indica, que apesar de não significativa, esta percentagem de etanol pode ter influenciado de forma negativa a viabilidade das células.

Finalmente, no ensaio com 4% de etanol, verifica-se um valor de viabilidade celular de 97,87%. Continua a verificar-se um decréscimo na viabilidade com o aumento da percentagem de etanol. No entanto, estes valores não são significativos e é muito pouco provável que tenham influência nos resultados dos estudos de biodisponibilidade.

Um estudo com a linha celular do adenocarcinoma intestinal caco-2, concluiu que percentagens de etanol acima de 1% poderiam causar danos nas células, após 60 minutos de incubação com este composto. (Lemos *et al.* 2007). No entanto, é necessário ter em conta as diferenças morfológicas e genéticas entre as diferentes células dos vários tecidos ao longo do trato gastrointestinal.

Assim, pode afirmar-se que com 4% de etanol a monocamada de células parece manter a sua integridade global, corroborando o ensaio da TEER e reforçando a segurança no uso desta quantidade nos ensaios de transporte. Assim, uma percentagem superior a 4% de etanol seria possivelmente para descartar pois até esta concentração verificou-se um decréscimo de cerca de dois pontos percentuais.

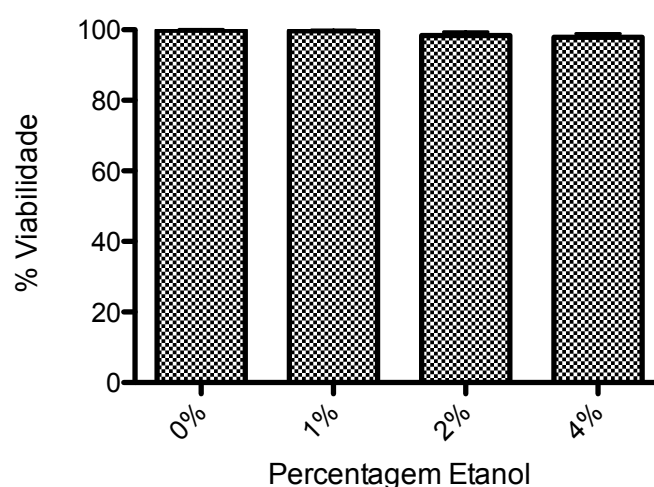


Figura 15. Representação gráfica da viabilidade da linha celular MKN-28 exposta a diferentes concentrações de etanol. (n=6).

4.4. Efeito do etanol no transporte de antocianinas na linha celular MKN-28

A eficiência de transporte de antocianinas totais através das células MKN-28 foi determinado ao longo de 3 horas. Resumidamente, as células da linha celular MKN-28 foram cultivadas em poços de *Transwell*® durante 7 dias até atingirem a confluência. De seguida removeu-se o meio de cultura e lavaram-se as células com meio Hanks pH 7,4 no lado basolateral e com meio Hanks pH 5,0 no lado apical. As soluções de antocianinas (100 μ M) com ou sem etanol (0 % e 4%) foram adicionadas ao lado apical dos poços em meio Hanks pH 5 e ao lado basolateral foi adicionado meio Hanks pH 7,4 com 2% de SFB. O transporte transepitelial foi seguido em função do tempo, a 37° C. Recolheram-se alíquotas (150 μ L) do lado basolateral e repôs-se o volume com meio Hanks aos 30, 60, 120 e 180 min. De seguida cada alíquota foi analisada por uHPLC a 520 nm. Foi possível verificar que todas as antocianinas presentes no extrato inicial foram absorvidas e detetadas no lado basolateral (Figura 16 e Anexo A) e que a eficiência de transporte aumentou ao longo do tempo atingindo um máximo de cerca de 5% ao fim de 3h de incubação.

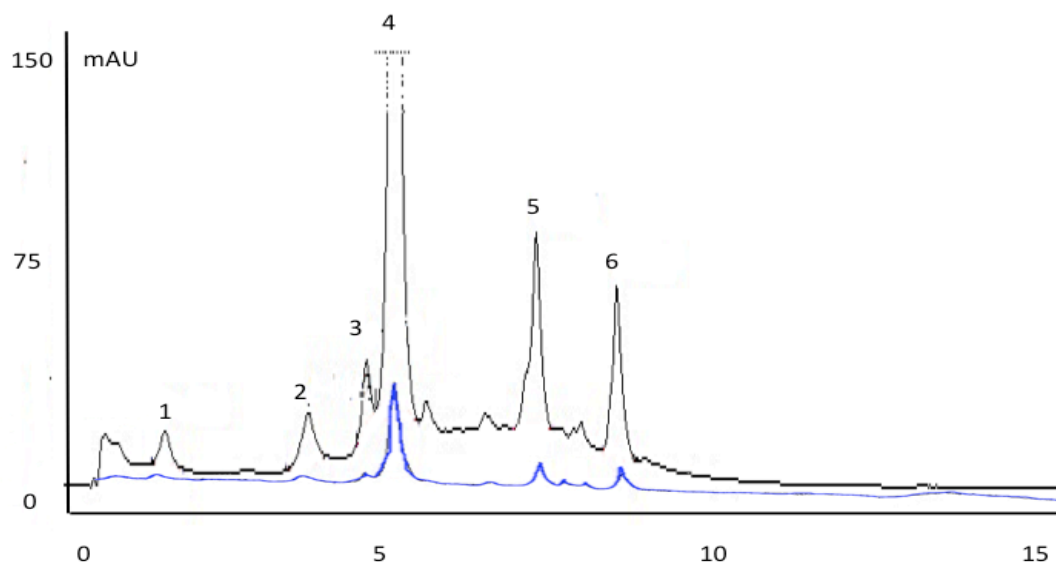


Figura 16. Cromatograma representativo da fração apical (preto) e da fração basolateral ao fim de 180 minutos (azul). 1 - delphinidina-3-glucose; 2 – petunidina-3-glucose; 3 – peonidina-3-glucose; 4 – malvidina-3-glucose; 5 – malvidina-3-acetilglucose; 6 – malvidina-3-cumaroilglucose. gradiente de eluição: 0 – 7 min: 94,5% A – 64% A; 7 – 10 min: 64% A – 20% A; 10 – 10,1 min: 20%A – 0%A; 10,1 – 12 min: 100% B isocrático; 12 – 15 min: 94,5% A , 5,5% B isocrático. Fluxo 0,5 mL/ min. Volume de injeção 10 μ L. Deteção a 520 nm. Solventes: solvente A – 5% HCOOH; solvente B – 100% ACN.

O etanol é um componente presente em qualquer vinho. Este é resultado da fermentação dos açúcares no processo de vinificação. Após uma refeição normal, considerando a ingestão de um copo de vinho (200 mL), a percentagem de etanol que se encontrará no estômago será cerca de 1 a 2%. Assim, para testar o extremos da presença e da ausência de etanol, decidiu-se alargar o espectro de concentrações para 0% e 4%.

Observando a figura 17 podemos verificar que ocorre um aumento da eficiência de transporte ao longo do tempo. Esta observação é perfeitamente compatível com o modelo de estudo utilizado, pois verifica-se um efeito cumulativo dependente do tempo, que se traduz neste crescimento contínuo.

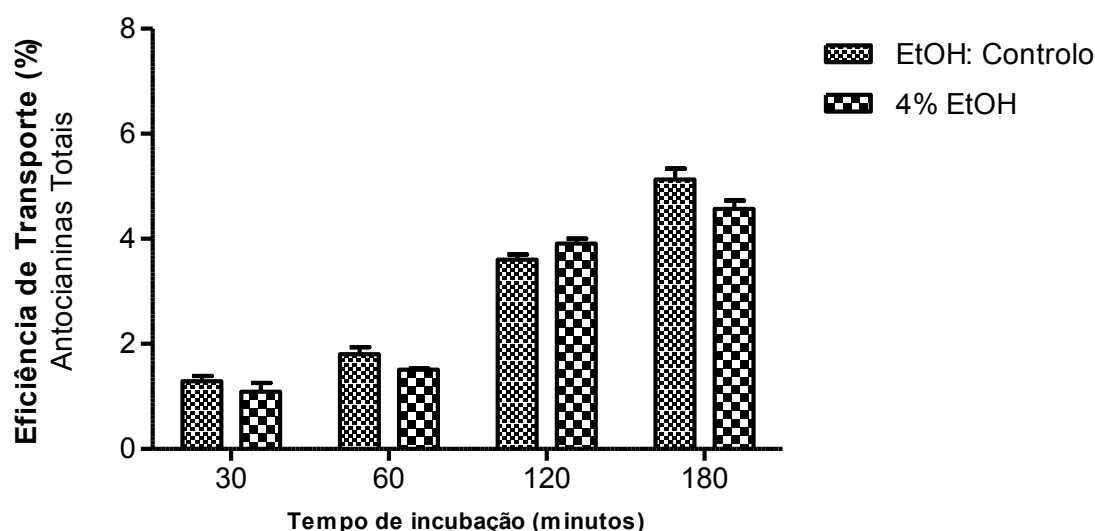


Figura 17. Representação gráfica da eficiência de transporte de antocianinas pela linha celular MKN-28 a diferentes concentrações de etanol. Etanol: controlo – 0% etanol; EtOH 4% – 4% etanol. Os resultados não apresentam diferenças significativas. (n= 6-16).

É possível verificar que ao fim de 30, 60 e 120 minutos, as diferenças entre a presença e ausência de etanol não revelam ser significativas.

Analisando os valores obtidos ao fim de 180 minutos, observa-se uma vez mais que não existem diferenças significativas entre eles. O que sugere que o etanol não terá influência no transporte de antocianinas ao longo desta linha celular.

Vários estudos têm sido realizados numa tentativa de perceber a influência do etanol no transporte de flavonóides ao longo de diferentes tecidos (Faria *et al.* 2009; Faria *et al.* 2010, Andlauer *et al.* 2003; Bub *et al.* 2001). No entanto, este tema ainda é controverso uma vez que alguns autores afirmam existir um efeito potenciador e outros negam a existência de tal capacidade.

Num desses estudos, os autores mostraram que o etanol (1%) exerceu um efeito positivo na absorção de antocianinas pelo epitélio intestinal ao fim de 120 minutos, mimetizado pela linha celular caco-2 (Faria *et al.* 2009).

Num estudo posterior dos mesmos autores (Faria *et al.* 2010), foi utilizada a linha celular RBE4 (endotélio capilar cerebral de rato imortalizado), para proceder ao estudo do transporte de flavonoides na barreira hemato-encefálica. Os autores concluíram que uma percentagem de 0,1% de etanol não exerceu qualquer tipo de efeito na absorção dos flavonoides ao longo do estudo.

É necessário ter em consideração que o impacto dos resultados sobre a absorção e biodisponibilidade de antocianinas, estão em muito dependentes do tipo modelo utilizado (linhas celulares, animais, estudos em humanos).

Neste estudo, verificou-se que o etanol não exerce um efeito facilitatório no transporte de antocianinas ao nível do estômago.

Este resultado não está de acordo com o observado para outros tecidos do trato gastrointestinal (Faria *et al.* 2009). Este facto poderá ser explicado pelas diferenças morfológicas existentes em todo o sistema digestivo.

Para além disto, os resultados aqui obtidos, vão contra a teoria de que o etanol facilita a absorção de flavonoides ao longo do trato gastrointestinal (Dragoni *et al.* 2006). Neste estudo os autores utilizaram tecido do jejuno de ratinhos. Estes foram expostos à presença de vinho de mesa desalcoolizado e com álcool durante 20 minutos a 37°C graus.

As diferenças no método e o tipo de tecido utilizados podem mais uma vez explicar a disparidade encontrada entre os resultados.

É possível observar no gráfico (figura 17), que os valores da eficiência de transporte são baixos, atingindo um máximo de 5,1% para o caso sem etanol e 4,6% para o caso onde o etanol não estava presente. Este resultado torna-se interessante, pois,

como já foi dito anteriormente, as antocianinas estão associadas a diversos efeitos benéficos para a saúde. Assim, esta observação sugere que as antocianinas exercem os seus efeitos biológicos, apesar da baixa quantidade que é transportada, reforçando o conhecimento na literatura acerca desta característica das antocianinas.

O efeito de matriz também poderá exercer um papel importante no sucesso do transporte. Os resultados obtidos para o transporte das antocianinas no caso em que o etanol não se encontra presente, são mais baixos que o transporte de antocianinas puras, isoladas, que em condições semelhantes atingiram uma eficiência de transporte de cerca de 10% ao fim de 180 minutos (Fernandes *et al.* 2012). Isto sugere que a matriz poderá exercer um efeito inibitório no transporte destes compostos. Uma vez que se está a testar um extrato de antocianinas, é fácil compreender que a matriz é composta por uma rede complexa de compostos mais ou menos simples, para além das próprias antocianinas. Isto poderá, de facto provocar uma diminuição na quantidade transportada por diversas razões: competição com os sistemas de transporte das antocianinas, conjugação com as antocianinas ou mesmo diminuição do espaço livre para a antocianina se dirigir para locais próximos das zonas de absorção.

Os resultados sugerem que a presença de etanol parece não influenciar o transporte das antocianinas através das células MKN-28. Esta observação, sugere, por sua vez, que bebidas sem álcool ricas em antocianinas poderão também assim exercer os efeitos benéficos associados a estes compostos.

4.5. Influência da glucose no transporte de antocianinas pela linha celular MKN-28

A glucose presente no vinho de mesa, em estudo, é um dos componentes da matriz do vinho que pode influenciar a absorção das antocianinas ao nível gástrico. No vinho tinto, este componente encontra-se na forma livre, tal como acontece em alguns frutos, podendo assim exercer um potencial efeito. Assim, realizaram-se estudos de transporte para perceber de que forma a glucose poderá interagir com a absorção de antocianinas ao nível do estômago, uma vez que um dos açúcares presentes nas antocianinas do vinho de mesa é a glucose.

Muito resumidamente, as células da linha celular MKN-28 foram cultivadas em poços de *Transwell*® durante 7 dias até atingirem a confluência. De seguida removeu-se o meio de cultura e lavaram-se as células com meio Hanks pH 7,4 no lado basolateral e com meio Hanks pH 5,0 no lado apical. As soluções de antocianinas (100 µM) com diferentes concentrações de glucose (0 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM, 250 mM e 500 mM), foram adicionadas ao lado apical dos poços em meio Hanks pH 5 (5,5 mM de glucose) e ao lado basolateral foi adicionado meio Hanks pH 7,4 (5,5 mM de glucose). O transporte transepitelial foi seguido em função do tempo, a 37° C. Recolheram-se alíquotas (150 µL) do lado basolateral e repôs-se o volume com meio Hanks aos 30, 60, 120 e 180 min. De seguida cada alíquota foi analisada por uHPLC a 520 nm.

A figura 18 apresenta os resultados obtidos. É necessário ter em conta que a quantidade mínima testada de glucose não foi 0 mM, apesar de ter sido utilizada uma solução de antocianinas sem glucose na sua constituição, uma vez que o meio utilizado possui uma quantidade própria de glucose, necessária como fonte de energia para as células. Assim a concentração mínima efetiva testada neste caso foi de 5,5 mM (como indicado na figura 18). O objetivo principal do estudo foi tentar perceber se o aumento da glucose poderia ou não influenciar de alguma forma o transporte de antocianinas.

É possível verificar que ao fim de 30 minutos, para todas as concentrações testadas, os valores de eficiência de transporte são muito semelhantes, sem diferenças significativas entre eles. No entanto, após 60 minutos observa-se um ligeiro aumento na eficiência do transporte de antocianinas no caso em que há menos quantidade de glucose em comparação com as restantes concentrações.

Ao final dos 120 e dos 180 minutos, esta diferença acentua-se bastante, verificando-se claramente uma eficiência muito superior para o caso da solução com 20 mM de glucose.

O padrão verificado ao longo do tempo de ensaio está de acordo com o modelo de estudo utilizado.

Um das primeiras observações interessantes que se retira destes resultados é, tal como no caso do etanol, a ação não imediata dos sistemas envolvidos no transporte das antocianinas, pois apesar do efeito cumulativo, a taxa de aumento de transporte varia ao longo do tempo de forma positiva indicando uma ativação de um maior número de elementos envolvidos no sistema de transporte.

Várias proteínas e transportadores membranares, são sintetizados e recrutados após uma série de cascatas de sinalização que envolvem recetores membranares, mensageiros secundários, efetores, entre outros. Todo este processo, muitas das vezes, bastante complexo, é moroso, podendo em determinados casos demorar horas. Está descrita a expressão de transportadores de glucose (GLUT's) nas células MKN-28 (Noguchi *et al.* 1999).

Outra observação interessante que se retira da análise destes resultados, são os valores para a eficiência de transporte para as concentrações de 100, 250 e 500 mM ao longo de todo o ensaio. Os valores mantêm-se constantes sem diferenças significativas entre eles. É possível observar que apenas 1% das antocianinas passa durante todo o ensaio. Isto sugere que o aumento da concentração de glucose diminui claramente a eficiência do transporte das antocianinas. Esta observação é compatível com o envolvimento de um sistema de transporte de glucose no transporte de antocianinas através da membrana das células MKN-28. O facto de os valores da eficiência de transporte se manterem constantes ao longo do tempo para as concentrações mais elevadas, sugere que poderá estar envolvido um sistema de transporte saturável.

No entanto, como foi referido acima, cerca de 1% das antocianinas continua a ser transportada ao longo de todo o ensaio. Isto sugere que para além deste sistema de transporte que parece também interagir com a glucose, poderá existir outro tipo de transporte, numa perspetiva secundária responsável pela absorção destes flavonoides. É de notar também, que este transporte não será ativado por cascata de sinalização uma vez que o fluxo de transporte é igual do início ao fim. Este facto

pode explicar também a razão pela qual ao fim de 30 minutos os valores são iguais para as 4 concentrações testadas.

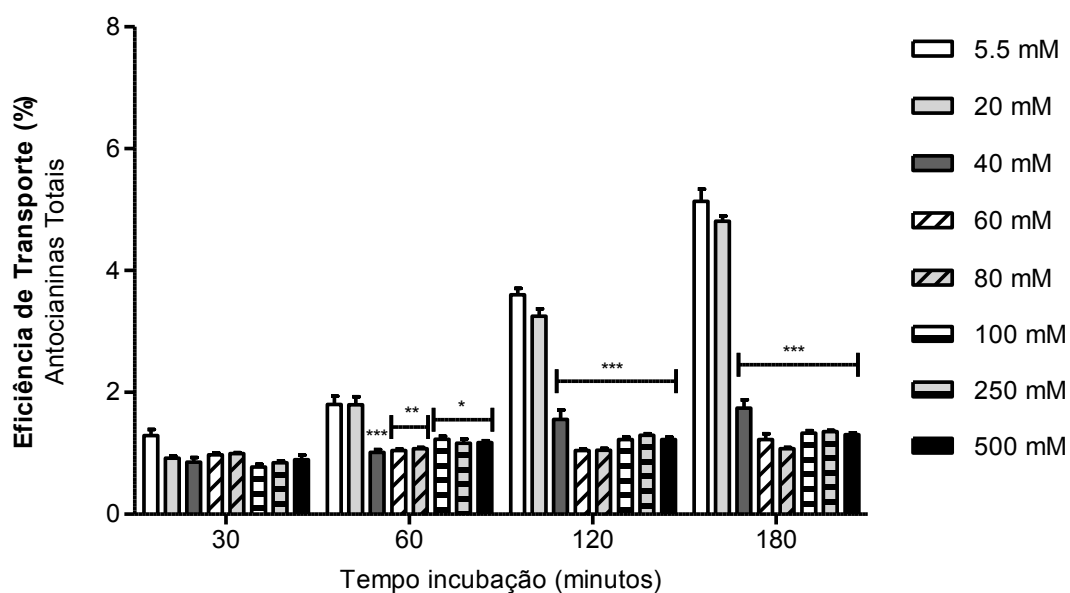


Figura 18. Representação gráfica da eficiência de transporte de antocianinas pela linha celular MKN-28 a diferentes concentrações de glucose (5,5, 20, 40, 60, 80, 100, 250 e 500 mM). * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$ *** $p < 0,01$, (n=4-16).

É claro que de 20 mM para 100 mM o sistema de transporte envolvido na absorção das antocianinas fica saturado. Assim, numa tentativa de perceber qual a concentração de glucose efetivamente necessária para fazer esta saturação, realizou-se o mesmo ensaio com um espectro mais estreito de concentrações.

Dos 40 mM para os 60 mM ainda se nota um pequeno decréscimo, apesar de considerado não significativo pela análise ANOVA a dois fatores realizada. Assim, será entre as concentrações 40 e 60 mM de glucose que o sistema de transporte envolvido no transporte de antocianinas fica saturado.

À semelhança do que aconteceu no ensaio do etanol, a percentagem global de antocianinas transportada foi baixa.

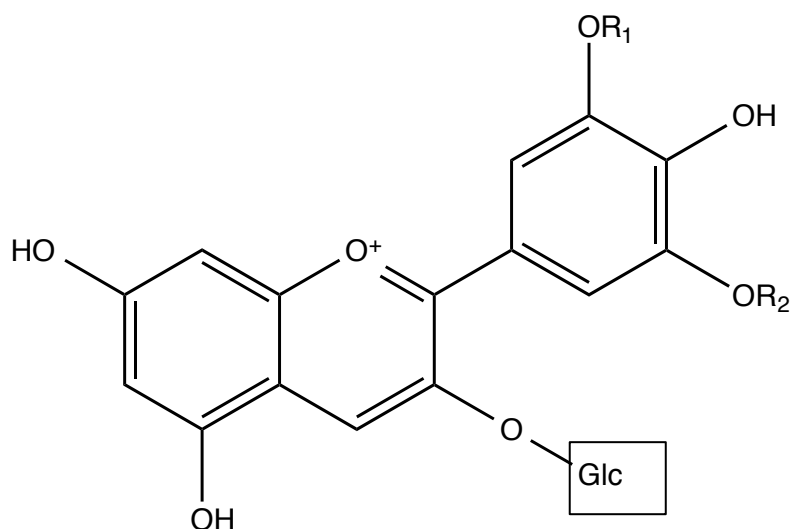


Figura 19. Representação da estrutura geral de uma antocianina com destaque para o resíduo de glucose.

Até ao início do século XXI o estudo da cinética das antocianinas tanto em ratos como em humanos mostrou ser um desafio complexo (Cao *et al.* 1999, Milbury *et al.* 2002; Murkovic *et al.* 2001, Tsuda *et al.* 1999).

Posteriormente, foi demonstrado através de um estudo *in vivo* em ratos a capacidade das antocianinas em atravessar a mucosa gástrica (Passamonti *et al.* 2003). Também nesse ano, um outro estudo mostrou que os glucósidos de antocianinas eram rapidamente e eficientemente absorvidos pelo estômago (aproximadamente 25%). No entanto, a sua absorção varia bastante de acordo com a estrutura da antocianina e eram rapidamente excretadas na bilis na sua forma nativa ou metabolizada (Talavera *et al.* 2003).

Vários estudos se foram seguindo, com diferentes matrizes de antocianinas, chegando a diferentes e importantes conclusões. Foi sugerido que as antocianinas não são metabolizadas no estômago, uma vez que não se encontraram vestígios de metabolitos nestes órgãos (Talavera *et al.* 2005). Foi analisada a absorção gástrica de pelargonidina em ratinhos e observou-se ao fim de duas horas a presença de ácido p-hidroxibenzóico, o que é indicativo não da metabolização da antocianina mas sim da sua instabilidade e degradação (Mohsen *et al.* 2006).

A referência mais recente sobre a absorção de antocianinas ao nível do estômago é de 2006 (Felgines *et al.* 2006). Neste estudo, os autores examinaram a absorção gástrica de pelargonidina-3-glucose usando modelos de ratinhos. Uma vez mais, verificaram que esta antocianina era rapidamente absorvida no estômago após 30 minutos.

Em todos estes trabalhos, os valores de absorção das antocianinas rondaram os 20%, o que difere bastante dos resultados obtidos neste trabalho. No entanto é preciso ter em conta que os modelos utilizados foram diferentes do modelo aqui usado, e que neste trabalho foi utilizada uma matriz de antocianinas complexa.

Com a informação anterior, as antocianinas surgem como compostos que conseguem ultrapassar a barreira gástrica e atingir a circulação, estando assim disponíveis para exercerem as suas funções biológicas aproximadamente 30 minutos após a ingestão, o que parece estar de acordo com o resultados obtidos neste trabalho.

A grande conclusão de todos estes estudos é o importante papel do estômago como reservatório de antocianinas e a facilidade de absorção, mas os possíveis mecanismos de transporte continuam por esclarecer.

Nesta matéria, a biodisponibilidade da cianidina-3-glucose em ratos alimentados com extratos de laranja vermelha com ou sem glucose através de entubação gástrica não foi afetada significativamente pela ingestão simultânea da glucose (Felgines *et al.* 2008).

A informação acerca da cinética das antocianinas do trato gastrointestinal é crucial para entender a absorção destas. Após se alimentar ratos com extratos de amoras através de entubação gástrica, o conteúdo antociânico no lúmen do estômago diminuiu linearmente ao longo de 180 minutos (He *et al.* 2009). O tempo estimado para eliminar metade do conteúdo em antocianinas do estômago foi de 120 minutos, sugerindo que ao fim de 4 horas conteúdos vestigiais ainda se encontravam presentes. Ainda neste trabalho, os autores deram importância a um factor que pode explicar a baixa quantificação de antocianinas nos estudos de biodisponibilidade. As antocianinas parecem associar-se com proteínas não identificadas no tecido gástrico e como tal a sua quantificação por HPLC fica subestimada.

O transportador de aniões orgânicos bilitranslocase é expresso no estômago (Battiston *et al.* 1999, Nicolin *et al.* 2005). O seu transporte normal *in vitro* mostrou ser competitivamente inibido por formas quinoidais de antocianinas presentes numa dieta normal, sugerindo que a bilitranslocase poderá promover a difusão facilitada de antocianinas (Passamonti *et al.* 2002). No entanto, é necessário ter em conta que o trabalho realizado por estes autores foi conduzido a pH 8,0, que está longe de representar as condições gástricas onde as formas quinoidais não são detetadas (Figura 8).

Outros transportadores candidatos incluem o GLUT1, OAT2, SMCT1 e SMCT2, uma vez que a sua expressão está já documentada no estômago (Eraly *et al.* 2004, Yoshikawa *et al.* 2011).

Uma vez que as antocianinas possuem um resíduo de açúcar na sua estrutura, em particular, a glucose (figura 19), o candidato principal para sistema de transporte destas será, na teoria, um transportador envolvido no metabolismo da glucose. Está documentado na literatura o envolvimento de transportadores de hexose na absorção de glucósidos de flavonoides, como a quercetina-3-glucósido, ancorados a resíduos de glucose (Walgren *et al.* 2000).

Um estudo realizado em células do adenocarcinoma humano de cólon (caco-2), mostrou o envolvimento do GLUT2 no transporte de antocianinas ao longo da barreira intestinal (Faria *et al.* 2009). Neste estudo o transporte de glucose por parte do GLUT2 diminuiu, apesar do aumento da expressão do transportador, com a adição de antocianinas. Os autores explicam este facto como uma possível competição entre a glucose e as antocianinas para este sistema de transporte.

Todos os resultados obtidos neste trabalho reforçam os que já se encontram documentados na literatura e trazem novos dados. Assim, em suma:

- a eficiência do transporte de antocianinas diminui com o aumento da concentração de glucose.
- o sistema de transporte envolvido parece ser saturável.
- a ativação do sistema de transporte parece não ser imediata.
- poderão estar envolvidos outros sistemas secundários.
- parece haver competição entre as antocianinas e a glucose, o que sugere envolvimento de um sistema envolvido no metabolismo deste açúcar.

4.6. Influência do pH no transporte de antocianinas pela barreira gástrica

Como já foi referido, as antocianinas apresentam diferentes formas estruturais de acordo com o pH a que se encontram (figura 4 e figura 8). Nesta parte do trabalho, pretendeu-se avaliar o efeito de diferentes valores de pH no transporte de antocianinas pela barreira gástrica. De uma forma sucinta, as células foram cultivadas em placas de *Transwell*® seguindo os mesmos procedimentos dos estudos anteriores. Aquando do estudo de transporte, foram adicionadas duas soluções de antocianinas a pH diferentes, pH 5 (valor no estômago após uma refeição) e pH 7.

A pH 5, no estômago, a forma predominante é a pseudo base carbinol (hemiacetal), com alguma presença de catião flavílio, enquanto que a pH 7, a forma predominante é a pseudo base carbinol aniónica.

Assim, tendo em conta as características químicas destas três estruturas, é fácil perceber diferenças entre as duas soluções de antocianinas.

A solução a pH 5 terá uma carga superior à solução a pH 7. Os valores de pH normalmente encontrados no estômago variam entre 3 e 5, no estado não alimentado e alimentado, respetivamente. O valor de pH 7 é uma condição muito dificilmente atingida neste órgão, mas foi utilizado para provar a importância do pH ácido na absorção destes compostos e para avaliar a eficiência dos transportadores no caso das formas neutras ou aniónicas. Numa situação normal, um indivíduo irá ingerir vinho durante ou após uma refeição, não em jejum, sendo que as antocianinas provenientes desta fonte alimentar dificilmente irão estar sujeitas a um pH com valores próximos do 3.

Pela figura 20, é possível verificar diferenças claras entre os dois valores de pH. O ensaio segue o comportamento padrão verificado para os estudos anteriores e que é típico deste método de análise.

Ao final de 30 minutos é possível verificar já um ligeiro aumento do transporte para pH 5 em relação ao pH 7, apesar de pela análise estatística ser considerado não significativo.

Ao final dos 60 minutos continua a observar-se uma tendência crescente desta diferença até que aos 120 minutos é possível verificar que o transporte de

antocianinas pelas células expostas à solução com pH 5 é claramente superior à solução com pH 7. Esta diferença aumenta ainda mais ao final dos 180 minutos.

Geralmente as proteínas envolvidas no transporte de compostos ao longo das membranas contêm várias zonas diferenciadas. Zonas com aminoácidos maioritariamente hidrofóbicos, outras zonas com aminoácidos hidrofílicos e zonas com cargas maioritariamente positivas ou negativas.

Teoricamente, o transporte será mais eficaz se cargas opostas forem colocadas em conjunto uma vez que serão atraídas mais facilmente podendo, neste caso, o ligando interagir numa extensão com a proteína e esta transportá-lo com maior eficácia.

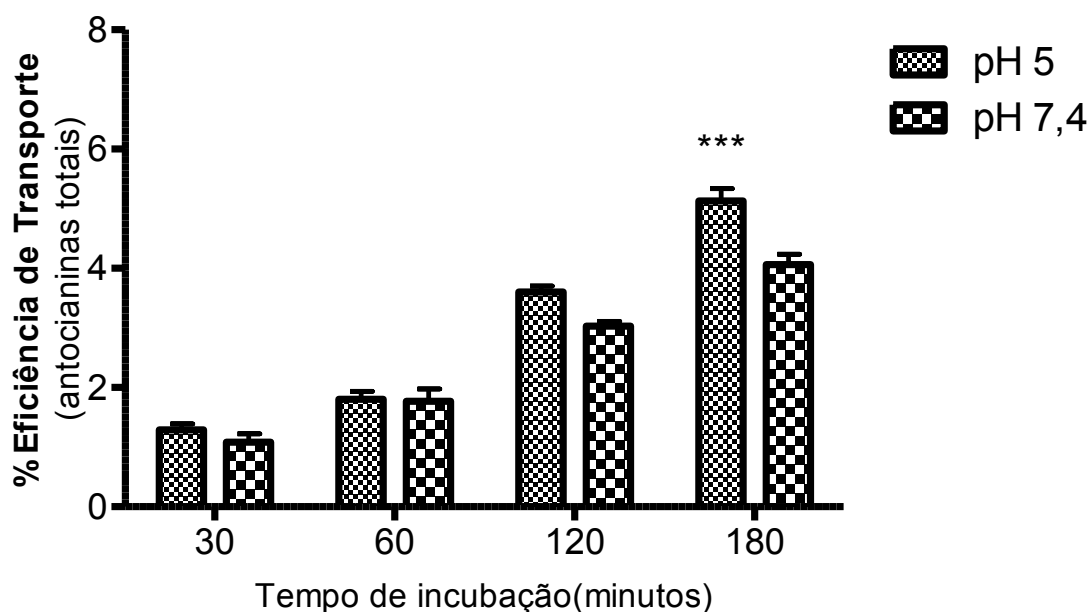


Figura 20. Representação gráfica da eficiência de transporte de antocianinas pela linha celular MKN-28 a diferentes valores de pH (5 e 7). *** $p < 0,01$. (n=5-16).

Uma vez que a solução a pH 5, com grande predominância de hemiacetais, tem uma carga superior à da solução a pH 7 (com a forma aniónica), é de suspeitar que o transportador envolvido tenha mais afinidade para as formas hemiacetal das antocianinas.

Apesar de serem epitélios diferentes, com características diferentes, este facto pode talvez explicar os valores de transporte de antocianinas obtidos num estudo com caco-2, onde atribuíram a responsabilidade por este fenómeno ao GLUT-2 (Faria *et al.* 2009). No intestino, o pH é normalmente mais alto que no estômago (pH 6-7), aumentando a espécie aniónica exponencialmente (figura 8). Assim, uma vez que o transportador envolvido terá, eventualmente, uma zona de interação com as antocianinas com carga global negativa, o transporte é bastante menor.

É importante ter em conta que a morfologia das células MKN-28 e caco-2 é diferente, existindo diferentes transportadores na sua membrana, o que pode explicar que mesmo a pH 7 os valores obtidos neste trabalho sejam superiores aos valores obtidos no estudo com caco-2. No entanto, também poderão existir transportadores semelhantes, que poderão estar envolvidos no mecanismo principal de transporte das antocianinas.

4.7. Exposição prévia a antocianinas e o seu papel do transporte destas

Numa cascata de sinalização metabólica, é necessário que haja a ativação de diferentes componentes ao longo do percurso, em diferentes pontos específicos no tempo. Em determinadas situações, a adaptação evolutiva permite a otimização dos processos quando estes são ativados repetida e periodicamente. Assim, para mimetizar o efeito de uma exposição crónica a antocianinas no transporte destes flavonóides, foi realizado o seguinte estudo: as células foram cultivadas em poços de *Transwell*® durante 7 dias até atingirem a confluência, em meio RPMI 1640. Metade da placa, a cada 2 dias, foi sujeita à exposição a uma solução de antocianinas (100 μ M) em meio Hanks pH 5 durante 3 horas. Após a exposição, tanto o meio apical como o meio basal foram renovados. O procedimento seguinte foi igual ao procedimento dos estudos anteriores.

É possível verificar pela figura 21 que ao fim de 180 minutos uma diferença significativa no transporte de antocianinas entre os dois casos. Apesar de as diferenças serem ligeiras nota-se, ao longo do tempo, um aumento da diferença, o que sugere um efeito positivo da exposição prévia no transporte.

Seria de esperar, no entanto, que se notassem diferenças numa fase mais prévia do estudo, uma vez que se realmente houver efeito positivo por parte da exposição

prévia, uma das otimizações estaria provavelmente relacionada com a rapidez. No entanto isto não se verifica.

Na bibliografia não há referências sobre a exposição prévia a antocianinas e o seu efeito do transporte das mesmas ao longo do epitélio gástrico.

Por outro lado, num estudo com caco-2, os autores sugerem que a exposição crónica a antocianinas interfere positivamente com o transporte destas pela linha celular do adenocarcinoma do cólon. No entanto, não sugerem o mecanismo que possa estar envolvido (Faria *et al.* 2009)

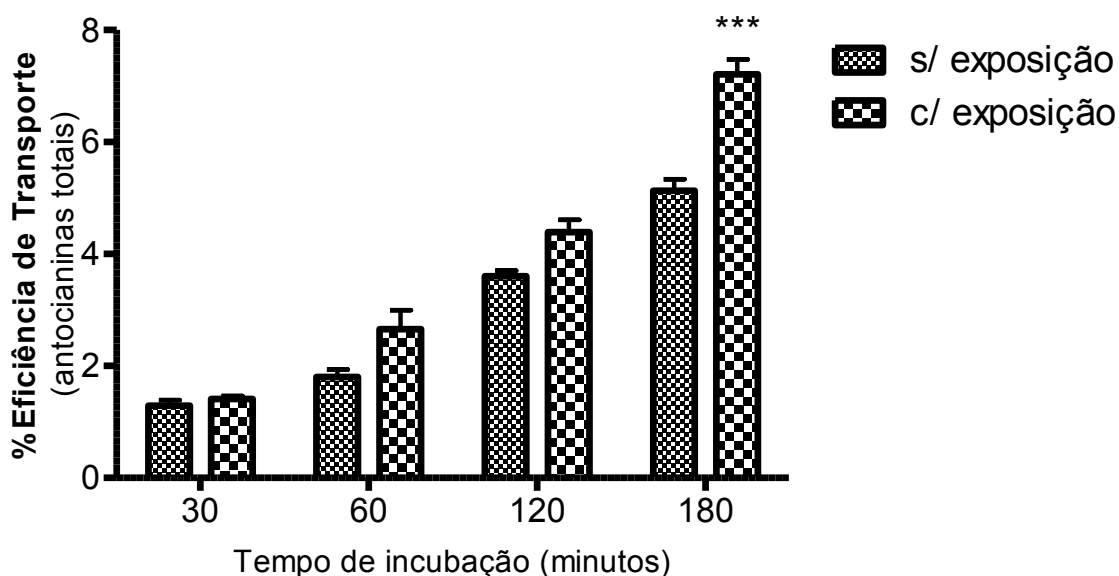


Figura 21. Representação gráfica da eficiência de transporte de antocianinas pela linha celular MKN-28 com e sem exposição prévia a antocianinas. **p<0,05. (n= 6-16)

A análise dos resultados obtidos por uHPLC implicou a otimização prévia do método, que será posteriormente descrito.

4.8. Otimização de um método de análise de antocianinas por uHPLC

Tanto a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), como a ultra cromatografia líquida (uHPLC), são usadas na separação dos componentes de um determinado composto. Para perceber a diferença entre HPLC e uHPLC, é necessário primeiro entender do que trata especificamente o método de HPLC. Isto porque, de uma maneira simplificada, se pode afirmar que o uHPLC é uma versão melhorada do HPLC e pode ser mais facilmente entendido se a noção de HPLC estiver bem presente. A técnica de HPLC é amplamente utilizada para fazer a identificação, a quantificação e a separação de componentes de uma determinada mistura. Utiliza pressões elevadas para fazer passar os solventes pela fase estacionária (a coluna de HPLC). É muito utilizado em Bioquímica para a análise de constituintes de um determinado composto (geralmente associado com um espectómetro de massa). É assim ideal para a separação e identificação de aminoácidos, proteínas, carboidratos, pesticidas, antibióticos, polifenóis, entre outros.

A metodologia HPLC tem inúmeras vantagens face a outros métodos de cromatografia líquida mais rudimentares. Permite uma rapidez e precisão de análise maiores; as colunas podem ser reutilizadas sem que se tenha que proceder ao reempacotamento (desde que no programa de análise se reserve uma parte para a limpeza); há um maior controlo sobre os parâmetros que definem a eficiência da separação; fácil automação dos instrumentos e análise de dados; e grande adaptabilidade a processos de larga escala. Isto é possível também porque a metodologia HPLC utiliza colunas com partículas de tamanho reduzido (5 μM) e áreas de superfície elevadas, e permite a aplicação de pressões elevadas para o fluxo do solvente.

Na metodologia uHPLC, o tamanho das partículas usado nas colunas é geralmente menor que 2 μM . Isto permite uma melhor separação comparativamente com a metodologia HPLC, pois o número de pratos teóricos da coluna é significativamente maior. Também permite obter análises extremamente rápidas, uma vez que utiliza pressões muito mais elevadas e colunas mais pequenas. Uma bomba de HPLC normalmente ronda os 40 MPa de pressão, enquanto que a bomba de uHPLC pode chegar aos 100 MPa de pressão. Isto faz com que seja possível obter cromatogramas com uma melhor separação e com uma precisão de análise muito superior. Outra das grandes vantagens é a necessidade de muito menos quantidade de composto para analisar e de muito menos quantidade de solventes para cada

corrida, uma vez que estas são muito mais rápidas. Chega mesmo a ser possível detetar compostos que não são detetáveis na metodologia HPLC normal.

Assim, uma vez que para uma análise extensa e correta da biodisponibilidade das antocianinas é necessário o máximo de precisão, foi desenvolvido um método de análise destes flavonoides por uHPLC, com o objetivo de analisar os resultados dos estudos de transporte efetuados.

Obteve-se um cromatograma com o perfil em antocianinas de um vinho de mesa (figura 22), a partir de um método de HPLC bem estabelecido usado no laboratório onde se realizou o estudo. Os solventes utilizados neste método foram – solvente A: 10% ácido fórmico em água; solvente B: 10% ácido fórmico e 30% acetonitrilo em água. Utilizou-se um fluxo de 1mL/ min e o gradiente de eluição foi o seguinte: dos 0 aos 70 min o solvente A foi de 80% para 15%. Dos 70 aos 90 fez-se lavagem com 100% do solvente B, tendo-se reposto as concentrações iniciais de seguida.

Este cromatograma serviu de modelo para a otimização do método de uHPLC para a análise de antocianinas que foi desenvolvido. Estão representadas as principais antocianinas presentes no vinho de mesa, apesar da deteção de mais picos, uma vez que a presença destas é predominante.

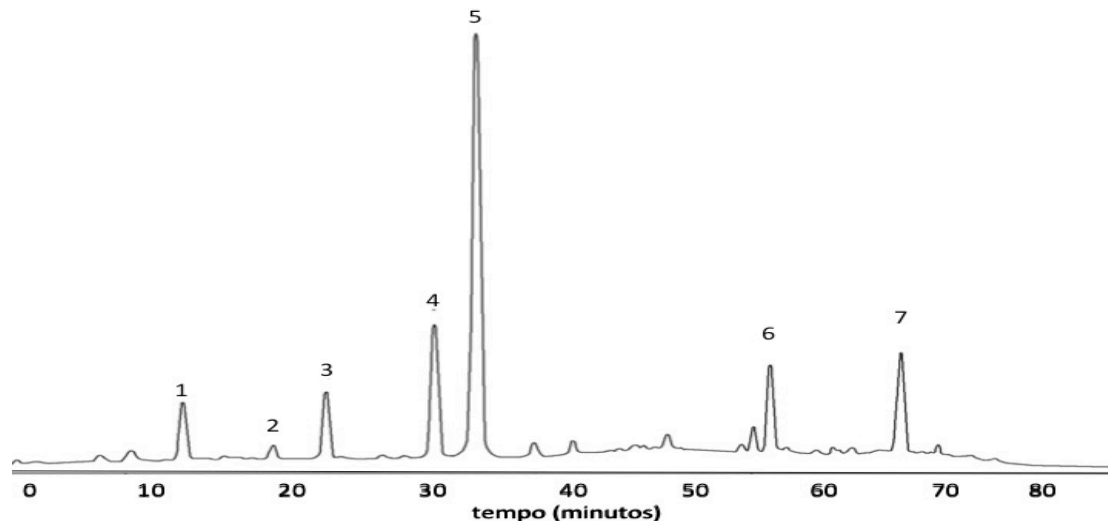


Figura 22. Cromatograma representativo do perfil antociânico de um vinho de mesa, em HPLC, segundo o gradiente de eluição: 0-70 min: 80%A – 15%A; 70-90 min: 100% B isocrático; 90-130 min: 80%A e 20% B isocrático, Fluxo 1,0 mL/min. Volume de injeção 50 µL. Deteção a 520 nm. Solventes: A – 10% HCOOH; B- 10%HCOOH/ 30%ACN. 1 - delfinidina-3-glucose; 2 – cianidina-3-glucose; 3 – petunidina-3-glucose; 4 – peonidina-3-glucose; 5 – malvidina-3-glucose, 6 – derivado acético da malvidina-3-glucose; 7 – derivado cumárico da malvidina-3-glucose.

Numa primeira aproximação foram usados como solventes dois compostos amplamente usados neste tipo de análise, a água e o acetonitrilo. Assim, como

solvente com características polares mais acentuadas utilizou-se água com 1% ácido fórmico (solvente A), uma vez que para posteriores análises em espectrómetros de massa (muito sensíveis à quantidade de ácido) é necessário ter as mesmas condições; e como solvente menos polar, água com 30% acetonitrilo e 1% ácido fórmico (solvente B). O tempo de corrida estabelecido foi de 15 minutos com um fluxo de 0,5 mL/min. O gradiente de eluição foi o seguinte: dos 0 minutos aos 8 minutos estabeleceu-se um gradiente que se iniciou com 100% do solvente A diminuindo a quantidade deste para 65% nos 8 minutos; dos 8 aos 9 minutos estabeleceu-se um aumento da quantidade de solvente B para 100%, mantendo-se esta quantidade isocrática durante mais 2 minutos, correspondendo este tempo à fase de lavagem da coluna; dos 12 minutos aos 15 minutos restabeleceram-se as condições iniciais correspondendo este tempo à fase de estabilização do sistema para posterior injeção. A quantidade de amostra de vinho de mesa injetada foi de 10 µL. A detecção foi feita a 520 nm.

Como se pode ver pela figura 23, o cromatograma revela apenas 3 picos, o que não é correspondente ao verificado no cromatograma obtido por HPLC para a mesma amostra. Assim conclui-se que a amostra não foi eficientemente separada, o que se traduz na necessidade de uma mudança no método.

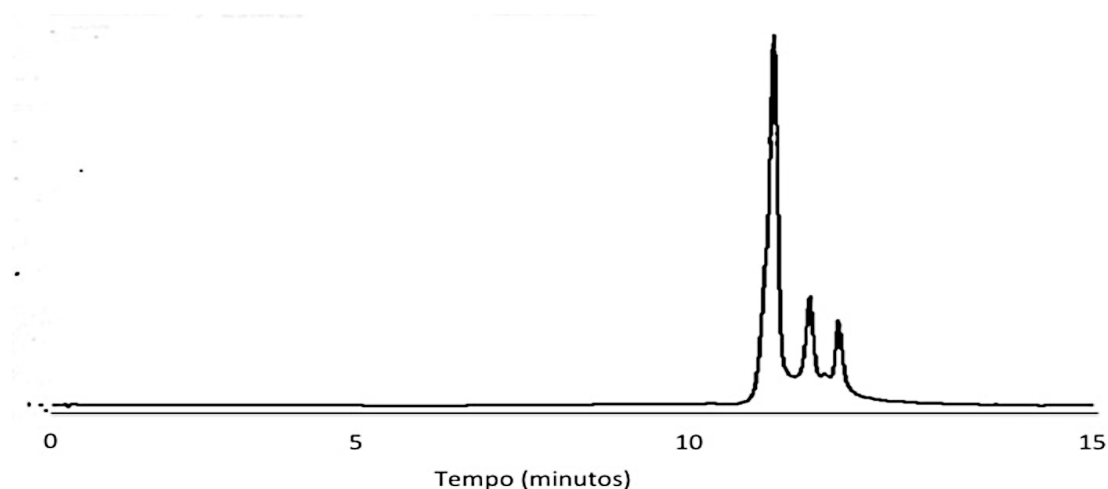


Figura 23. Cromatograma representativo do perfil antociânico de um vinho de mesa segundo o gradiente de eluição: 0 – 8 min: 100% A – 65% A; 8 – 9 min: 65% A – 0% A; 9 – 11 min: 100% B isocrático; 11 – 12 min: 100% B – 0% B; 12 – 15 min: 100% A isocrático. Fluxo 0,5 mL/ min. Volume de injeção 10 µL. Detecção a 520 nm. Solventes: solvente A – 1% HCOOH; solvente B – 1% HCOOH/ 30% ACN.

Após algumas alterações nos parâmetros obteve-se o cromatograma da figura 24. O fluxo foi estabelecido nos 0,5 mL/ min e o gradiente de eluição foi o seguinte: dos 0 minutos aos 6 minutos, o solvente A variou de 93% para 70%; dos 6 minutos até aos

6,1 minutos a quantidade de solvente A decresceu de 70% para 0%; dos 6,1 minutos até aos 9 minutos a quantidade de solvente A manteve-se nos 0% (100% solvente B), correspondendo à fase de lavagem da coluna; dos 9 minutos aos 15 minutos foram restabelecidas as condições iniciais (93% solvente A e 7% solvente B).

O perfil cromatográfico aproxima-se bastante do perfil obtido na figura 22. É possível observar as principais antocianinas e derivados presentes no vinho de mesa (Dp-3-glc, Pt-3-glc, Pe-3-glc, Pg-3-glc, Mv-3-glc, derivado cumárico da Mv-3-glc, derivado acético da Mv-3-glc), no entanto, é um perfil cromatográfico com algumas irregularidades na linha de base e no aspeto geral dos picos.

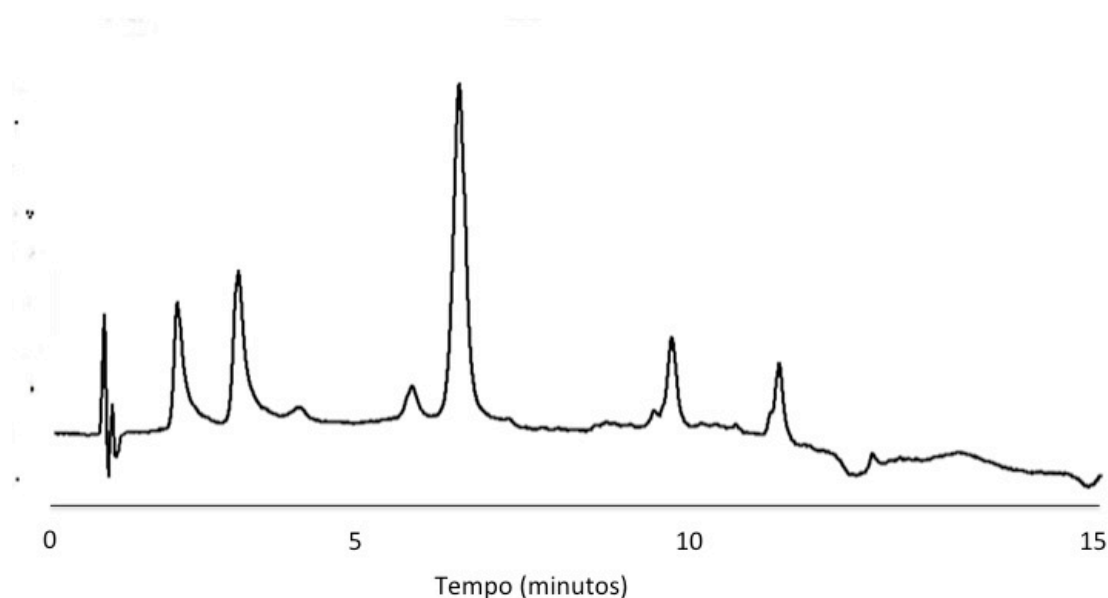


Figura 24. Cromatograma representativo do perfil antociânico de um vinho de mesa segundo o gradiente de eluição: 0 – 6 min: 93% A – 70% A; 6 – 6,1 min: 70% A – 0% A; 6,1 – 9 min: 100% B isocrático; 9 – 15 min: 97% A , 3% B isocrático. Fluxo 0,5 mL/ min. Volume de injeção 10 µL. Detecção a 520 nm. Solventes: solvente A – 5% HCOOH; solvente B – 100% ACN.

Após algumas alterações mínimas no gradiente de eluição anteriormente realizado, chegou-se a uma solução que mostrou ser eficaz na separação dos picos cromatográficos (figura 25). É possível ver que o perfil cromatográfico obtido foi semelhante ao perfil de HPLC com uma separação satisfatória e estreitamento dos picos bastante positiva. O gradiente utilizado foi o seguinte: dos 0 minutos aos 7 minutos o solvente A decresce de 94,5% até aos 64%; dos 7 aos 10 minutos verifica-se um decréscimo de solvente de 64% até 20%; dos 10 minutos aos 10,1

minutos a quantidade de solvente A foi reduzida a 0% mantendo-se em 100% a quantidade de solvente B dos 10,1 aos 12 minutos, correspondendo à fase de lavagem da coluna; dos 12 minutos aos 15 minutos restabeleceram-se as condições iniciais.

Ficou, com este gradiente, estabelecido o método para se proceder à análise de todos os estudos de transporte efetuados neste trabalho. Foram realizadas várias injeções ($n > 15$) para comprovar a robustez do método na análise de antocianinas a 520 nm. Definiu-se o volume de injeção 10 μ L.

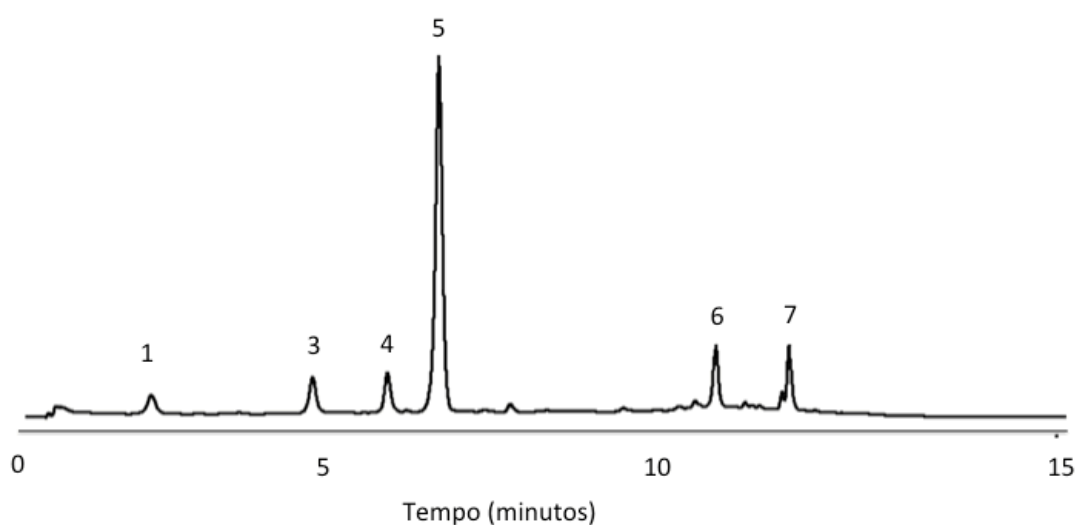


Figura 25. Cromatograma representativo do perfil antociânico de um vinho de mesa segundo o gradiente de eluição: 0 – 7 min: 94,5% A – 64% A; 7 – 10 min: 64% A – 20% A; 10 – 10,1 min: 20%A – 0%A; 10,1 – 12 min: 100% B isocrático; 12 – 15 min: 94,5% A , 5,5% B isocrático. Fluxo 0,5 mL/ min. Volume de injeção 10 μ L. Detecção a 520 nm. Solventes: solvente A – 5% HCOOH; solvente B – 100% ACN. 1- Delfinidina-3-glucose; 3- Petunidina-3-glucose; 4- Peonidina-3-glucose; 5- Malvidina-3-glucose; 6- Malvidina-3-acetilglucose; 7- Malvidina-3-cumaroilglucose.

Todos os resultados obtidos foram analisados através da quantificação total das antocianinas principais existentes num vinho de mesa, representadas na figura 22, apresentado-se, como foi sendo referido ao longo da interpretação dos resultados anteriores o efeito dos diversos fatores sobre o conjunto das antocianinas como uma parte e não isoladas.

CAPÍTULO II: ESTUDO DA INTERAÇÃO DE ANTOCIANINAS COM O TRANSPORTADOR DE GLUCOSE, GLUT-1.

INTRODUÇÃO GERAL

O interesse no estudo de sistemas moleculares, recorrendo a métodos computacionais, tem vindo a aumentar progressivamente ao longo do tempo. O sucesso da aplicação destes métodos tem permitido, em vários casos, antecipar resultados que geralmente só são obtidos por dispendiosas e complicadas técnicas experimentais. Além disso, mesmo quando os resultados experimentais estão disponíveis estes métodos permitem interpretar e organizá-los de modo a solucionar ou sugerir novos procedimentos de forma a dar resposta a determinado problema.

Para esta evolução dos métodos computacionais muito tem favorecido o desenvolvimento dos computadores cujo desempenho, durante as últimas décadas, tem registado grandes avanços.

Quando os métodos computacionais são aplicados à bioquímica entramos no domínio da bioquímica computacional. Dado que existe um grande número de procedimentos computacionais aplicados a diferentes áreas da química, a química computacional apresenta-se hoje como um domínio interdisciplinar, ramificando-se pelas diferentes áreas em que é costume dividir a Química (Bioquímica, Química Teórica, Química Computacional, Química-Física, Química Orgânica, Química Inorgânica, Química Analítica, etc.).

O principal objectivo da bioquímica computacional é obter resultados que sejam relevantes e permitam explicar um determinado problema químico num sistema biológico utilizando métodos computacionais. Os algoritmos, metodologias e teorias, que estão por trás destes programas, são geralmente desenvolvidos por químicos e físicos teóricos. Apesar de haver uma grande discussão entre os limites das áreas da química teórica e da química computacional, estas devem ser vistas como duas áreas complementares em constante dialéctica dado que, o desenvolvimento de novos modelos teóricos pode possibilitar o estudo de novos problemas (através do computador) e por outro lado os resultados da química computacional podem revelar limitações e sugerir melhoramentos de determinada teoria.

Atualmente a química teórica e computacional já atingiu um grau de maturidade relevante e permite não só calcular propriedades individuais das moléculas, tais como: calores de formação, energias de ionização, energia e estrutura das moléculas, energia e estrutura dos estados de transição, distribuição de carga em moléculas, momentos dipolares, frequências de vibração, propriedades espectroscópicas (UV- Vis, RMN, EPR); mas, também propriedades que resultam da interação de agregados moleculares, tais como: mecanismos de reações,

otimização de geometrias de complexos moleculares, energias de ativação e de reação, propriedades estruturais, previsão da estrutura de proteínas por métodos de homologia, identificação de padrões entre estruturas químicas, desenho de novas moléculas, métodos de docking, estrutura e dinâmica de fases condensadas.

Dado que sob o ponto de vista teórico e computacional cada problema pode ser interpretado e estudado sob vários pontos de vista diferentes, têm sido desenvolvidas várias metodologias para dar resposta a estes desafios. Duma forma geral estas metodologias podem ser classificadas em três categorias principais: métodos baseados na função de onda (normalmente subdivididos em métodos *ab initio* e métodos semi-empíricos), métodos baseados no funcional de densidade (DFT) e métodos baseados na mecânica clássica.

1.1. Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular é atualmente uma ferramenta muito usada no estudo de biomoléculas, sendo frequentemente aplicada para investigar a estrutura, flexibilidade e as propriedades termodinâmicas de moléculas biológicas e dos seus complexos. Com efeito, este campo de investigação tem sido caracterizado por um desenvolvimento muito forte ao longo das últimas três décadas, após a publicação da primeira simulação de dinâmica molecular de uma proteína (o inibidor pancreático da tripsina bovina). Para isso muito contribuiu também o extraordinário desenvolvimento computacional verificado, fazendo com que continuamente novos limites em termos da dimensão dos sistemas estudados e do próprio tempo de simulação sejam ultrapassados. Em traços gerais, a dinâmica molecular estuda o comportamento dos sistemas moleculares ao longo do tempo, descrito pelas equações de movimento de Newton. Este capítulo apresenta uma introdução à dinâmica molecular, realçando os princípios básicos deste tipo de metodologia. As propriedades dinâmicas de uma proteína têm um efeito profundo no seu funcionamento.

O mesmo se verifica para a quase generalidade das moléculas biológicas. A compreensão destes aspectos reveste-se por isso de especial importância. As simulações de dinâmica molecular permitem o estudo destas propriedades, tornando possível que os vários processos dinâmicos que ocorrem em sistemas biológicos sejam analisados em detalhe e fornecendo informação detalhada acerca do movimento individual e colectivo das partículas destes sistemas em função do tempo.

Exemplos de aplicação da dinâmica molecular incluem o estudo de aspectos como a estabilidade proteica, o reconhecimento molecular, rearranjos conformacionais, o enrolamento proteico, propriedades do ADN e o transporte de substâncias através de membranas biológicas. Para além destes aspectos, as simulações de dinâmica molecular encontram também aplicação no refinamento de novos fármacos e na determinação de estruturas por RMN ou por cristalografia de raios X.

A dinâmica molecular permite o acompanhamento da evolução de um sistema molecular em função do tempo. O comprimento de uma simulação (ou tempo de simulação) é sempre por isso um aspecto crítico quando se fala de dinâmica molecular. Com efeito, diferentes fenómenos químicos envolvem diferentes escalas temporais e mesmo quando considerando apenas sistemas biológicos como proteínas, torna-se importante ter em atenção que os seus movimentos característicos têm escalas de tempo muito distintas, que vão desde os movimentos mais rápidos e localizados (característicos das flutuações atómicas) até aos movimentos mais lentos e globais (que envolvem rearranjos no sistema total). O tempo de simulação escolhido deve ser por isso adequado ao tipo de movimento a estudar. Deve ser no entanto tido em linha de conta, que os vários tipos de movimento característicos de um sistema biológico são interdependentes e estão acoplados, embora para algumas aplicações práticas possam ser considerados independentes.

1.2. Docking Molecular

No campo da modelação molecular, o *docking* é um método que prevê a orientação preferida de uma molécula em relação a uma segunda molécula quando estão associadas entre si, para formar um complexo estável (Lengauer *et al.* 1996) (Figura 26). O conhecimento da melhor orientação pode, por sua vez, ser para prever a força de associação ou ligação entre as duas moléculas usando por exemplo funções de *scoring*.

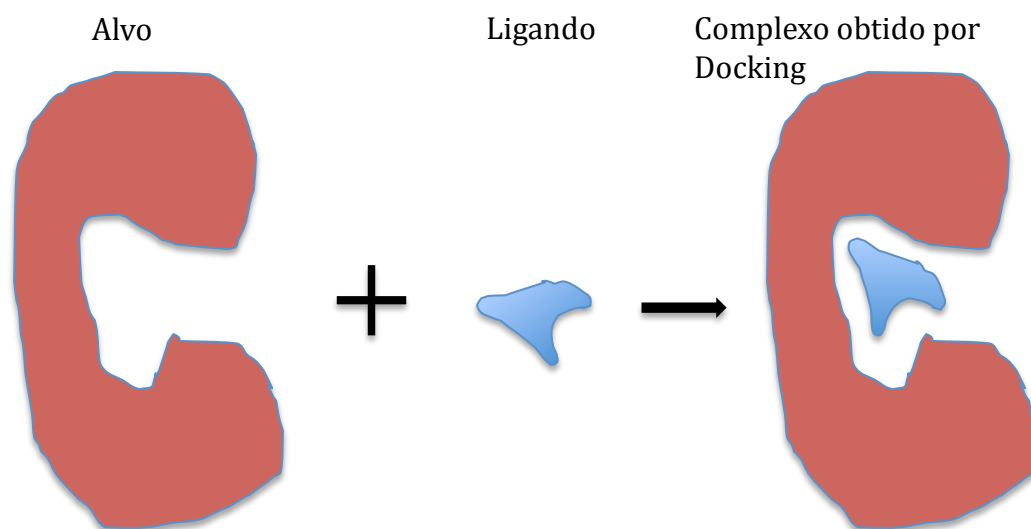


Figura 26. Representação esquemática do processo *docking* molecular.

As associações entre moléculas biologicamente relevantes como proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono e lípidos desempenham um papel central na sinalização molecular. Para além disso, a orientação relativa das duas partes intervenientes pode afetar o tipo de sinal produzido (por exemplo, agonismo vs antagonismo). Assim, o *docking* é bastante útil para prever não só a força da ligação mas também o tipo de ligação.

O *docking* molecular é frequentemente usado para prever a orientação de pequenas moléculas (fármacos) na ligação aos seus alvos (geralmente proteínas, ácidos nucleicos) no sentido de prever a afinidade e atividade da pequena molécula. Assim, o *docking* molecular também desempenha um papel essencial no design racional de fármacos (Kitchen *et al.* 2004). Dada a importância ao nível biológico e farmacêutico dos métodos de *docking* molecular, esforços consideráveis têm sido realizados no sentido de melhorar os métodos usados para a previsão das conformações de ligação.

Pode pensar-se no *docking* molecular como um problema do tipo “chave-fechadura”, em que se quer encontrar a orientação relativa da chave que irá abrir a fechadura. Aqui, a proteína (o recetor) pode ser considerada a fechadura e o ligando considerado a chave. O *docking* molecular pode assim ser definido como a otimização de um problema que irá descrever a melhor orientação de encaixe de um ligando a uma determinada proteína de interesse.

A investigação na área do *docking* molecular centra-se nas simulações computacionais de processos de reconhecimento molecular. Pretende alcançar uma conformação correta do ligando em relação à proteína (ou recetor), assim como a orientação relativa entre os dois de tal forma que a energia livre da totalidade do sistema seja minimizada.

1.2.1. A mecânica do docking

Para realizar um processo de *docking*, o primeiro requerimento é a estrutura do recetor de interesse. Usualmente a estrutura está já determinada através de técnicas experimentais de biofísica como cristalografia raio-X ou espectroscopia por ressonância magnética nuclear. O sucesso do programa de *docking* depende de dois componentes: o algoritmo de procura e a função de *scoring*.

Globalmente, o processo de *docking* molecular consiste em dois estágios complementares, cada um deles com os seus próprios algoritmos: i) o estágio de procura que encontra o número de *poses* possíveis para encaixar um ligando no local de ligação do alvo; e ii) um estágio de *scoring* que avalia a ligação entre ambas as moléculas, originando um *ranking* de *score* para cada *pose*.

1.2.1.1. Algoritmo de procura

O espaço de procura, em teoria, consiste em todas as orientações e conformações possíveis da proteína associada com o ligando. No entanto, na prática, com os atuais recursos computacionais, é impossível explorar exaustivamente o espaço de procura, pois isto iria envolver enumerar todas as possíveis distorções da molécula e todas as possíveis orientações rotacionais e translacionais do ligando relativamente à proteína. A maioria dos programas de *docking* em uso atualmente têm em conta a flexibilidade do ligando e diversas formas de tentar modelar um receptor flexível. Cada “fotografia” do par é referido como *pose*.

No início, quando o poder computacional era limitado, tornava-se impossível fazer aproximações com ambos os intervenientes flexíveis. Assim começou por se usar aproximações baseadas em ligandos e recetores rígidos.

São particularmente populares duas aproximações dentro da comunidade do *docking* molecular. Uma utiliza técnicas de *matching* que descrevem a proteína e o ligando como superfícies complementares (Goldman *et al.* 2000; Meng *et al.* 2004).

A segunda aproximação simula o processo de *docking* em que as energias de interação do par ligando-proteína são calculadas (Meng *et al.* 2004).

Os métodos de complementariedade estrutural descrevem a proteína e o ligado como um conjunto de propriedades que os tornam “dockáveis”. As simulações são, por sua vez, muito mais complexas. Nesta aproximação, a proteína e o ligando são separados por uma distância física, e o ligando encontra a sua posição no centro ativo da proteína após um certo número de movimentos no seu espaço conformacional.

Só mais tarde é que se evolui os métodos para a aplicação de ligandos flexíveis e recetores rígidos ou ligandos e recetores flexíveis, como é explicado a seguir.

Uma variedade de estratégias de procura conformacionais tem sido aplicada ao ligando e ao receptor. Estas incluem: procura sistemática e estocástica de ligações rotativas; simulações de dinâmica molecular e aplicação de algoritmos genéticos.

As conformações do ligando podem ser geradas na ausência do recetor e só depois serem “dockadas” ou então podem ser geradas na presença do local de ligação do recetor (Kearsley *et al.* 1994; Friesner *et al.* 2004), ou ainda com a aplicação da flexibilidade rotacional de todos os ângulos diedros através do uso do *docking* por fragmentação (Zsoldos *et al.* 2007). A avaliação da energia dos campos de força é também muitas vezes usada para selecionar conformações energeticamente favoráveis (Wang *et al.* 2007).

A capacidade computacional aumentou drasticamente na última década tornando possível o uso de métodos computacionais mais potentes e sofisticados no desenho de fármacos. No entanto, lidar com a flexibilidade do recetor nas metodologias de *docking* ainda é um tema delicado. A principal razão para esta dificuldade é a existência de um elevado número de graus de liberdade que têm que ser considerados neste tipo de cálculos. Negligenciar isto, no entanto, leva a resultados de *docking* pouco credíveis na previsão da melhor pose de ligação (Cerqueira *et al.* 2009)

Uma das estratégias passa por usar múltiplas estruturas estáticas determinada experimentalmente para mimetizar a flexibilidade do recetor (Totrov *et al.* 2008). Alternativamente podem ser usadas livrarias de rotameros com cadeias laterais de

aminoácidos que rodeiam a cavidade de ligação para gerar conformações energeticamente favoráveis (Hartmann *et al.* 2009).

1.2.1.2. Função de scoring

As funções de *scoring* usam uma pose como input e geram um número indicativo da probabilidade de essa pose representar uma interação de ligação favorável.

O objetivo de uma função de *scoring* é estimar de uma forma apropriada a afinidade de ligação entre o recetor e o ligando.

A maioria das funções de *scoring* são baseadas em métodos físicos de mecânica molecular que estimam a energia de uma determinada *pose*; para métodos baseados em campos de força, uma energia baixa (negativa) indica um sistema estável e por conseguinte uma possível interação de ligação. Uma aproximação alternativa é fazer a derivação de um potencial estatístico para as interações a partir de uma base de dados com complexos proteína-ligando, e avaliar o encaixe do ligando de acordo com o potencial inferido.

Existe um grande número de estruturas de complexos entre proteínas e ligandos obtidas por cristalografia de raio-X. As funções de *scoring* podem ser validadas recorrendo a estas bases de dados, efetuando o *docking* correto de ligandos de alta afinidade. No entanto elas também originam conformações plausíveis para ligandos que na realidade não ligam. Isto origina um elevado número de *hits* falso positivos, isto é, ligandos que são previstos como interactuantes com a proteína e que não ligam quando testados experimentalmente *in vitro*.

Actualmente, o número de funções de *scoring* para processos de *docking* molecular, é elevado. Estas podem ser agrupadas em quatro categorias principais: funções de *scoring* baseadas em campos de força; funções de *scoring* empíricas; potenciais *knowledge-based* e funções de *scoring* consensuais.

1.2.2. Aplicações

Uma interação de ligação entre uma pequena molécula e uma enzima/proteína pode resultar na ativação ou na inibição desta. Se a proteína é um recetor transmembranar, a associação do ligando pode resultar em agonismo ou antagonismo. O *docking* molecular é usualmente utilizado no campo do desenho de

fármacos – a maioria destes são pequenas moléculas orgânicas, e o *docking* pode ser aplicado a:

- identificação de *hit compounds* – o *docking* combinado com as funções de *scoring* podem ser usadas para rapidamente analisar uma base de dados de potenciais ligandos *in silico* para identificar moléculas plausíveis de ligação à proteína de interesse, o chamado *virtual screening*;
- Otimização de compostos *lead* – o *docking* pode ser usado para prever onde e em que orientação relativa o ligando se liga à proteína (a pose). Esta informação pode ser, por sua vez, utilizada para desenhar análogos mais seletivos e potentes;
- Biorremediação – também ser usado para prever poluentes que possam ser degradados por determinadas enzimas;
- Entre outros.

OBJETIVOS

O uso de métodos computacionais como complemento das técnicas experimentais é cada vez mais uma prática que se mostra essencial para aumentar e produzir conhecimento científico da forma mais precisa possível. Atualmente, existem áreas em que a falta do apoio computacional dita o sucesso ou insucesso do estudos em causa. Torna-se assim essencial estar na linha da frente da investigação.

Como foi verificado no capítulo I deste trabalho, a glucose parece competir com as antocianinas para o sistema de transporte. Isto sugere o envolvimento de transportadores de glucose na absorção das antocianinas ao nível do estômago. O GLUT1, é um transportador desta família normalmente presentes nas células epiteliais, e do qual existem estruturas cristalográficas bem caracterizadas. Assim, este transportador foi utilizado para se proceder ao trabalho realizado neste capítulo.

Neste trabalho, pretendeu-se estudar e caraterizar o transportador membranas de glucose, GLUT1 na interação deste com antocianinas.

Assim, este trabalho prendeu-se nos seguintes objetivos:

- Realização de *Docking* Molecular usando como recetor alvo o GLUT-1 e como ligandos a Cianidina-3-glucose, a Delfinidina-3-glucose e a Malvidina-3-glucose nas formas estruturais de catião flavílio e hemiacetal.
- Realização de uma Dinâmica Molecular para posterior análise de:
 - o Pontes de hidrogénio
 - o RMSd
 - o RMSF
 - o Hidratação do centro ativo

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparação da estrutura proteica

A estrutura cristalográfica do transportador de glucose (GLUT-1), utilizado neste estudo foi obtida na base de dados do *Protein Data Bank* (código 4PYP com uma resolução de 3,7 Å) (Deng *et al.* 2014).

A estrutura cristalográfica do homólogo do transportador de glucose (XylE), foi também obtida na base de dados do *Protein Data Bank* (código 4GBZ com uma resolução de 2,89 Å) (Sun *et al.* 2012)

Os átomos de hidrogénio foram adicionados utilizando o software X-Leap do AMBER (Case *et al.* 2008), tendo em conta a protonação de todos os resíduos no seu estado fisiológico.

3.2. Docking Molecular

Foram utilizadas 6 estruturas de 3 antocianinas em dois estados de protonação diferentes (catião flavílio e pseudo base carbinol ou hemiacetal), o que perfaz 6 ligandos para se proceder ao estudo de *Docking* Molecular. As antocianinas estudadas foram a cianidina-3-glucose, a delphinidina-3-glucose e a malvidina-3-glucose. O programa utilizado para construir as estruturas foi o GaussView (Carnegie Office Park Gaussian Inc., Bldg. 6, Pittsburg, PA 15106, USA). Adicionalmente foi utilizada a molécula de glucose para validar os resultados obtidos.

Estes compostos foram inicialmente “dockados” à proteína. O procedimento de *docking* molecular foi realizado com o software VsLab (Cerqueira *et al.* 2011) desenvolvido no Grupo de Química Teórica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Este software permite realizar o *docking* de um ligando ao local de interação de uma proteína e realizar processos de *screening* virtual para encontrar *hit* e *lead compounds* a partir de uma base de dados. Este programa encontra-se integrado no software VMD e recorre ao software AutoDock para realizar simulações de *docking* molecular com maior confiança nos resultados. Neste processo utilizou-se um método baseado num algoritmo genético com um total de 50 soluções. O número de avaliações e de gerações foi de 2500000 e 27000, respetivamente. O tamanho da população foi de 150.

Para definir o local de *docking* molecular recorreu-se à ferramenta AutoGrid, incluído no VsLab. Este software inclui todos os parâmetros necessários para mapear o local de ligação da proteína alvo e calcula os potenciais atômicos de afinidade para cada tipo de átomo da macromolécula. As melhores soluções de docking (S1 e S2) de cada antocianina foram subsequentemente utilizadas como estruturas iniciais para as minimizações e simulações de dinâmica molecular. As dimensões da caixa de *docking* utilizada foram: largura – 23,25 Å; altura – 21,75 Å; profundidade – 20,625 Å. O centro da caixa foi: X – -2,93; Y – 5,67; Z – 10,69. O número de pontos de espaçamento foi de 0,375, sendo o número total de pontos da grelha em X, Y e Z, 62, 58 e 55, respetivamente.

3.3. Dinâmica Molecular

Para calcular as geometrias otimizadas e as propriedades electrónicas de modo a fazer as parameterizações necessárias dos compostos, foi utilizada o programa Gaussian09 (Frisch, 2009) para realizar cálculos restritos de Hartree-Fock com a base de funções 6-31G(d). Esta metodologia foi escolhida por ser consistente com o processo de parameterização do AMBER. As cargas atômicas foram calculadas usando o algoritmo RESP (Bayly *et al.* 1993). Todas as otimizações de energia e simulações de dinâmica molecular foram realizadas com as parameterizações adotadas no software de simulações AMBER 10.0, usando o campo de forças Amber 1999 (parm99) para a proteína e o campo de forças GAFF (Wang *et al.* 2004) para as antocianinas.

Foram adicionados os contra-íões necessários (Na^+) para neutralizar as cargas negativas do sistema. O programa X-Leap foi também utilizado com este propósito. Um modelo de solvatação explícito foi utilizado com a caixa de solvatação de moléculas de água TIP3P pré-equilibrada, preenchendo uma caixa octaédrica truncada com uma distância mínima de 12 Å entre as faces da caixa e qualquer átomo da proteína. O tamanho deste sistema foi de aproximadamente 7500 átomos.

A simulação de dinâmica molecular consistiu numa fase de aquecimento e numa fase de pós-aquecimento. A fase de aquecimento foi de 100 ps a volume e temperatura constante e considerando condições periódicas de fronteira. Subsequentemente a simulação de dinâmica molecular foi seguida durante 25 ns com um *ensemble* isotérmico-isobárico nas condições PTN (pressão, temperatura e

número de moles constantes) para todos os sistemas onde a dinâmica de Langevin foi usada (frequência de colisão 1.0 ps^{-1}) para controlar a temperatura a 310,15 K (Izaguirre *et al.* 2001). Todas as simulações apresentadas foram realizadas usando o módulo PMEMD, implementado no software de simulações do AMBER 10.0 (Case *et al.* 2008). Os comprimentos de ligação envolvendo pontes de hidrogénio foram restringidos usando o algoritmo SHAKE, e as equações de movimento foram integradas a cada 2 fs usando o algoritmo de Verlet leapfrog (Ryckaert *et al.* 1977). O método *Particle-Mesh Ewald* (PME) (Essmann *et al.* 1997) foi usado para incluir as interações de longo alcance, sendo estas truncadas a 10 Å de distância do centro. A trajetória da dinâmica molecular foi registada a cada 2 ps e os resultados foram analisados com o módulo PTRAJ do AMBER 10.0. Foram calculados os valores de RMSd e RMSF para a totalidade dos sistemas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Homólogo bacteriano do transportador de glucose

O homólogo bacteriano do transportador de glucose (código PDB: 4GBZ) utilizado, foi caracterizado por Sun e seus colaboradores em 2012. Estes autores demonstraram que de várias proteínas da família dos transportadores de açúcares e seus homólogos, a proteína de simporte H^+ :D-xilose de *Escherichia coli* (XylE) (Henderson *et al.* 1990) foi a que demonstrou melhor comportamento em solução com os açúcares. As semelhanças com o GLUT-1 humano foram estabelecidas na ordem dos 49% e foram feitos estudos de interação com a glucose. A proteína foi cristalizada aberta para a matriz extracelular. Os autores afirmam ainda que a ligação da glucose neste transportador homólogo deverá ser semelhante ao que acontece no caso dos transportadores GLUT1-4 de humanos uma vez que os aminoácidos envolvidos na zona de ligação são praticamente invariantes (figura 27).

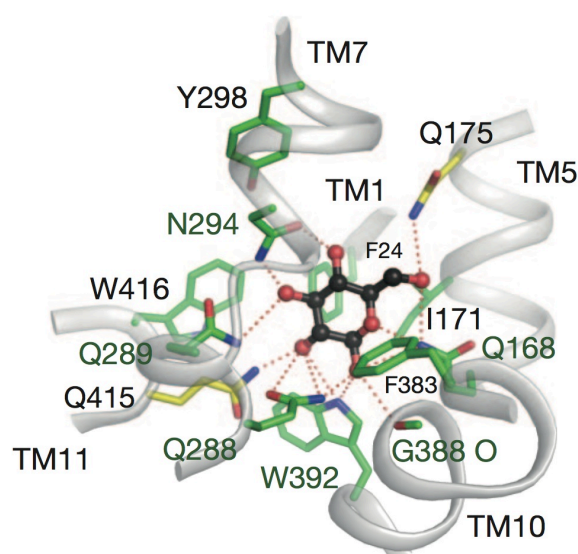


Figura 27. Coordenação da D-glucose com XylE. A D-glucose é representada a preto e vermelho. Estão representados os resíduos do centro de ligação da glucose à proteína e a verde representados os resíduos que são semelhantes nos GLUT1-4 humanos e no homólogo XylE. (adaptado de Sun *et al.* 2012)

Este torna-se, assim, um bom modelo de estudo para o *docking* das antocianinas. Este modelo foi usado inicialmente para validar o *docking* dos compostos testados e de seguida, efetuar um protocolo semelhante em relação à estrutura do transportador GLUT1 humano.

4.2. Docking molecular das antocianinas no transportador homólogo Xyle

Foi realizado o *docking* de 3 antocianinas em dois estados estruturais distintos (catião flavílio e pseudobase carbinol) no homólogo do GLUT1-4 de *Escherichia coli* (Xyle). As 3 antocianinas utilizadas foram a cianidina-3-glucose, a delphinidina-3-glucose e a malvidina-3-glucose. Estas 3 antocianinas foram escolhidas para todos os estudos computacionais por estarem normalmente presentes em matrizes alimentares como o vinho de mesa.

Resumidamente, o processo de *docking* molecular foi realizado, numa primeira fase, com a glucose, utilizando uma caixa que abrangeu o espaço interno do canal do transportador. As dimensões utilizadas para a caixa foram: largura – 19,87 Å; altura – 25,125 Å; profundidade – 17,25 Å. O centro da caixa foi: X - -18; Y – 29; Z – 2. Numa segunda fase, foi feito um *docking* molecular com uma caixa centrada no local de ligação da glucose em que as dimensões da caixa foram: largura – 23,25 Å; altura – 21,75 Å; profundidade – 20,625 Å e o centro foi: X - -17; Y – 22; Z - -3. A caixa usada para o *docking* molecular das antocianinas foi a segunda caixa.

Cada processo de *docking* molecular consistiu na geração de 50 soluções. Na figura 27 é possível observar o resultado do processo de *docking* molecular para as soluções com valores de *score* mais favorável, para cada uma das antocianinas na sua forma hemiacetal e catião flavílio.

Os valores de *score* para as formas catião flavílio e hemiacetal da Cy-3-glc, Dp-3-glc e Mv-3-glc estão representados na tabela 5 (duas melhores soluções encontradas).

O valor obtido para o processo de *docking* molecular utilizado para a glucose, foi de -6,61 kcal/mol. O valor de RMSD obtido entre a estrutura do recetor livre e a estrutura com a glucose ligada foi de 0,0 Å, o que sugere uma ligação bastante estável, permitindo validar o protocolo a ser aplicado para o estudo das antocianinas.

Como é possível concluir pela análise da tabela 5, os valores de energia livre de associação dos compostos fenólicos são mais favoráveis que os valores da glucose. Isto pode ser explicado pelo facto de uma antocianina conter uma maior quantidade de substituintes capazes de interagir com os aminoácidos da proteína. No entanto, analisando a figura 28, é possível verificar que o local de ligação das antocianinas é ligeiramente diferente do local onde a glucose se liga. Isto, inevitavelmente, fará com

que os resíduos potencialmente envolvidos na ligação poderão não ser os mesmos. É importante ter em conta que a caixa utilizada foi centrada no local de ligação da glucose, no entanto, alguns ajustes tiveram que ser feitos para se poderem obter valores de score favoráveis, uma vez que valores elevados e positivos são irrealis (para programas baseados em campos de forças). Isto pode explicar o facto de as antocianinas ficarem ligadas numa zona menos profunda da proteína, o que não será difícil de compreender uma vez que o tamanho destas é bastante superior ao da glucose. Este facto, não deverá no entanto invalidar a potencial interação das antocianinas com o transportador uma vez que este funciona com mudanças de conformação para efetuar a sua função.

A distância do substituinte de cada antocianina que se localiza na zona mais profunda do canal do transportador encontra-se a uma distância média de 2 Å do local de ligação da glucose. Apesar de ser uma distância relativamente pequena pode influenciar os resíduos proteicos envolvidos na ligação.

Tabela 5. Valores de energia livre de associação ($\Delta G_{\text{associação}}$) obtidos para as duas melhores soluções do *docking* molecular de cada antocianina nas duas conformações testadas e indicação do substituinte mais interno no canal do transportador.

Ligando	($\Delta G_{\text{associação}}$) (kcal/mol)	Substituinte mais interno no canal	Ligando	($\Delta G_{\text{associação}}$) (kcal/mol)	Substituinte mais interno no canal
Hemicetal Cy S1	-9,07	Anel B	Catião Cy S1	-9,46	Anel A
Hemicetal Cy S2	-8,03	Glucose	Catião Cy S2	-9,45	Anel A
Hemicetal Dp S1	-8,13	Glucose	Catião Dp S1	-8,85	Anel A
Hemicetal Dp S2	-7,09	Glucose	Catião Dp S2	-8,41	Glucose
Hemicetal Mv S1	-7,36	Glucose	Catião Mv S1	-8,99	Anel A
Hemicetal Mv S2	-6,35	Anel B	Catião Mv S2	-8,09	Glucose

É possível ainda ver na tabela 5 que a região das antocianinas que mais entrou no canal foi a glucose no caso das estruturas hemiacetais e o anel A no caso das estruturas catião flavílio. Isto pode ser resultado da carga positiva existente no anel C dos catiões, que está diretamente ligado ao anel A originando uma zona significativamente mais polarizada que no caso dos hemiacetais, fazendo com que o conjunto de anéis AC seja atraído para um local mais profundo que apresenta diversos aminoácidos com carácter polar.

O local de ligação dos compostos é composto por aminoácidos apolares como valinas e fenilalaninas e por aminoácidos polares neutros como tirosinas,

glutaminas, serinas, treoninas e asparaginas. Na figura 29 encontram-se os principais aminoácidos mais próximos do local de ligação das antocianinas.

Estes aminoácidos atribuem ao local de ligação polaridade e são aptos a formar pontes de hidrogénio, o que pode explicar a ligação das antocianinas nesta zona pois estas, à semelhança da molécula de glucose, também apresentam na sua constituição, um grande número de grupos hidroxilo. No geral constata-se que a forma de catião teve um valor de $\Delta G_{\text{associação}}$ ligeiramente superior apesar de não ser significativo.

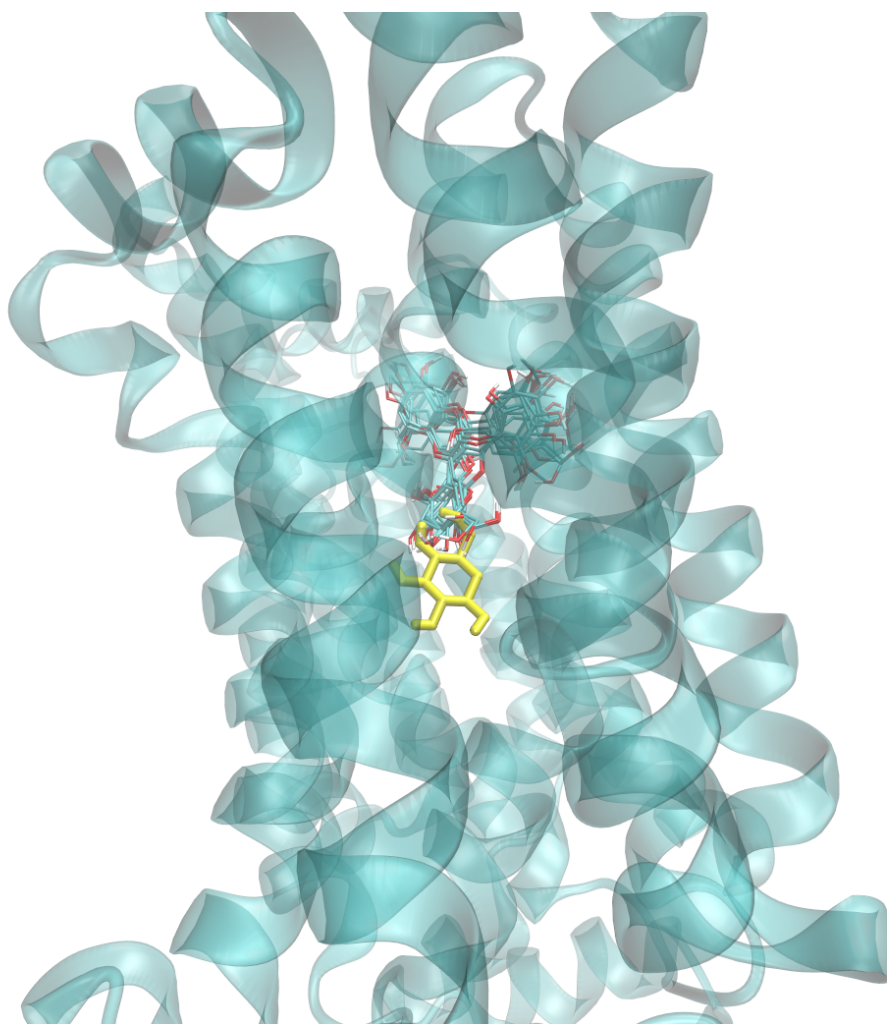


Figura 28. Local de *docking* da glucose (a amarelo) e das antocianinas (Cy-3-glc, Dp-3-glc, Mv-3-glc) nas formas de hemiacetal e catião flavílio no homólogo bacteriano do transportador de glucose XylE (código: 4GBZ).

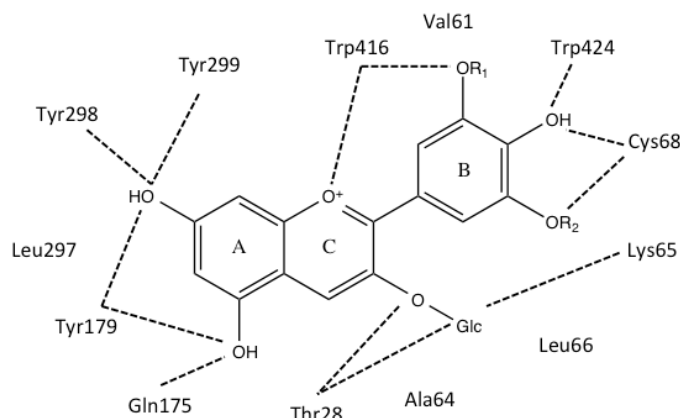


Figura 29. Mapa de resíduos do homólogo bacteriano XyleE presentes no local de ligação das antocianinas e as possíveis interações.

4.3. Transportador de glucose humano GLUT1

Muito recentemente (2014), Deng e seus colaboradores obtiveram a primeira estrutura cristalográfica do transportador de glucose humano GLUT1 (código PDB: 4PYP). Os autores obtiveram uma estrutura deste transportador na conformação aberta para o citoplasma.

A sobreposição do GLUT1 com a XyleE demonstrou semelhanças elevadas no domínio C da proteína. Isto sugere a existência de um local de ligação ao qual tanto se pode aceder pelo lado da matriz extracelular como pelo lado do citoplasma (Deng *et al.* 2014). Na estrutura cristalográfica do homólogo XyleE (Sun *et al.* 2012) os resíduos envolvidos na ligação da D-glucose fazem parte do domínio C da proteína. Na estrutura do GLUT1 os resíduos do domínio N não estão envolvidos na ligação (Deng *et al.* 2014). Estas observações indicam que o domínio C poderá representar o local de ligação principal, sendo o domínio N da proteína um local de ligação alternativo (Deng *et al.* 2014).

É possível observar pela figura 30 as semelhanças existentes entre o transportador homólogo e o transportador humano. No entanto, verifica-se que apenas ligeiras diferenças nas hélices evidenciadas determinam a abertura do transportador para o citoplasma, no caso do GLUT1 humano em relação ao homólogo que se encontra fechado. Na região direcionada para o citoplasma, o transportador homólogo possui uma hélice adicional, que como se pode ver pela figura 30, forma uma tampa

bloqueando o acesso ao citosol. Para além disso duas das suas hélices apresentam-se numa conformação mais fechada comparativamente com o GLUT1 humano. Pode verificar-se ainda que as diferenças na região do transportador direcionada para a matriz extracelular não são muitas, o que sugere que não haverá uma grande alteração conformacional nesta zona do transportador durante o processo de transporte dos compostos.

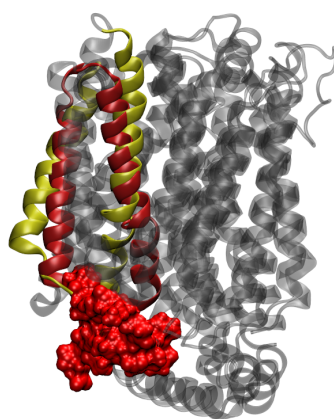


Figura 30. Comparação das estruturas cristalográficas do GLUT1 humano (4PYP) e do homólogo XylE (4GBZ). A vermelho encontram-se as hélices do homólogo bacteriano XylE e a amarelo as hélices do GLUT1 humano. É possível observar que as hélices do GLUT1 humano estão ligeiramente mais abertas no lado citosol. O homólogo bacteriano possui uma hélice adicional que funciona como tampa nesta zona.

4.4. *Docking* molecular das antocianinas no transportador de glucose humano GLUT1 (4PYP)

O processo de *docking* molecular realizado foi semelhante ao processo utilizado com o homólogo bacteriano do transportador. Uma vez que a zona de ligação nas duas estruturas é semelhante (Deng *et al.* 2014), utilizou-se uma caixa que abrangeu a zona de ligação da glucose na estrutura XylE (4GBZ), numa primeira fase. De seguida, para as antocianinas, utilizou-se uma caixa centrada na zona de ligação da glucose no transportador de glucose humano (4PYP).

Como é possível observar pela figura 31, o local de *docking* molecular da glucose e das antocianinas foi semelhante. Na tabela 6 encontram-se representados os valores para as melhores soluções de *docking* molecular obtidas para cada um dos ligandos testados. O valor de $\Delta G_{\text{associação}}$ obtido para a glucose foi de -6,10 kcal/mol, o que é muito semelhante ao obtido no caso do transportador homólogo. O local de ligação da glucose é também semelhante nas duas estruturas cristalográficas. Isto reforça a ideia de uma conservação do local de ligação independentemente da conformação adotada pelo transportador.

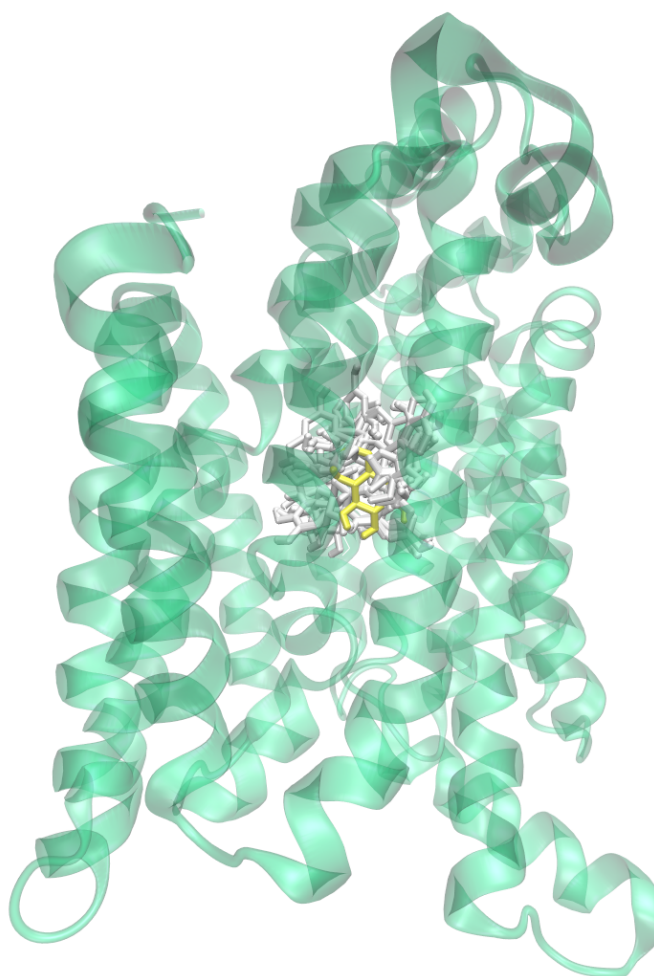


Figura 31. Local de *docking* da glucose (a amarelo) e das antocianinas (Cy-3-glc, Dp-3-glc, Mv-3-glc) nas formas de hemiacetal e catião flavílio no transportador de glucose humano GLUT-1 (código: 4PYP).

É possível observar na tabela 6 que os valores de $\Delta G_{\text{associação}}$ das antocianinas foram superiores aos valores da glucose, o que pode ser explicado, mais uma vez, pela maior complexidade das antocianinas em relação à glucose.

Neste caso, é possível verificar que as antocianinas entraram numa zona mais próxima do local de ligação da glucose, quando comparado com o que se verificou para a estrutura bacteriana (figura 30). Isto sugere que possivelmente, do lado interior da proteína o canal terá um diâmetro de abertura superior.

As antocianinas, ligam numa zona rica em aminoácidos apolares como valinas, fenilalaninas e triptofanos; aminoácidos polares neutros como histidinas, asparaginas, serinas, tirosinas e glutaminas e aminoácidos polares ácidos como o ácido glutâmico.

Tabela 6. Valores de energia livre de associação ($\Delta G_{\text{associação}}$) obtidos para as duas melhores soluções do *docking* molecular de cada antocianina nas duas conformações testadas e indicação do substituinte mais interno no canal do transportador.

Ligando	($\Delta G_{\text{associação}}$) (kcal/mol)	Substituinte mais interno no canal	Ligando	($\Delta G_{\text{associação}}$) (kcal/mol)	Substituinte mais interno no canal
Hemicetal Cy S1	-11,71	glucose	Catião Cy S1	-10,96	glucose
Hemicetal Cy S2	-10,26	Anel B	Catião Cy S2	-10,01	anel b
Hemicetal Dp S1	-11,84	Glucose	Catião Dp S1	-11,04	glucose
Hemicetal Dp S2	-10,11	anel B	Catião Dp S2	-9,94	anel B
Hemicetal Mv S1	-10,39	Anel A	Catião Mv S1	-9,35	anel B
Hemicetal Mv S2	-9,69	anel A	Catião Mv S2	-9,34	anel B

À semelhança do que acontece no local de ligação da estrutura XylE, a zona é constituída por aminoácidos que contribuem globalmente para a existência de polaridade. No entanto, é possível constatar que neste caso, esta contribuição é ainda maior devido à existência de um maior número de aminoácidos tipicamente polarizados. Isto pode explicar o facto de os valores de $\Delta G_{\text{associação}}$ serem mais favoráveis neste caso quando comparado com os resultados de *docking* no homólogo bacteriano (tabelas 5 e 6).

No global, verifica-se que os valores de $\Delta G_{\text{associação}}$ entre catiões e hemiacetais não são significativamente diferentes. No entanto, é possível verificar, que a parte aglicona das antocianinas na sua forma hemiacetal é preferida como forma de entrada pelo canal, tal como acontece no caso da forma catião flavílio. Isto não está de acordo com o observado no caso do homólogo, no entanto pode dever-se ao facto de a zona de ligação não ser exatamente a mesma (apesar de próxima) uma vez que os transportadores se encontram em conformações diferentes.

A figura 32, representa os aminoácidos principais existentes no local de ligação das antocianinas ao GLUT1.

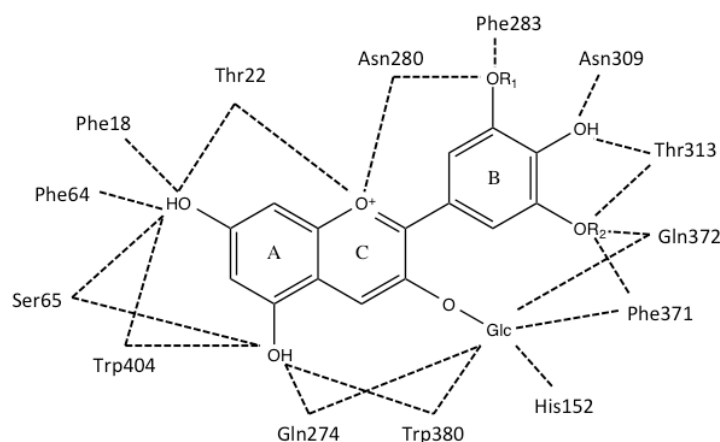


Figura 32. Mapa de resíduos do GLUT1 humano presentes no local de ligação das antocianinas e as suas possíveis ligações

Em ambas as proteínas transmembranares, se verifica que a malvidina-3-glucose é a antocianina com valores de $\Delta G_{\text{associação}}$ menos favoráveis. Isto pode dever-se ao facto de os substituintes do anel B serem grupos metilo e não grupos hidroxilo, tal como acontece com as outras antocianinas testadas, estabelecendo menores contactos hidrofóbicos com resíduos apolares.

O uso do homólogo foi vantajoso, por um lado, porque permitiu fazer a validação do *docking* das antocianinas através do uso da glucose como controlo e por outro lado porque permitiu estudar ambas as conformações da proteína (aberta para o meio extracelular e aberta para o citoplasma) uma vez que as semelhanças com o transportador humano são consideráveis. Assim, as principais conclusões que se podem tirar deste processo de *docking* molecular são:

- as antocianinas conseguem ligar-se aos lados do transportador de forma eficiente.
- não existem diferenças significativas entre os valores de energia livre de ligação para as formas hemiacetais e catiões.
- todas as antocianinas tiveram ligações consideravelmente boas com o recetor, sendo a ligação menos interessante a da malvidina-3-glucose.

As soluções encontradas por este estudo foram utilizadas para realizar uma análise de dinâmica molecular da interação do GLUT1 humano (código PDB: 4PYP) com cada uma das antocianinas no seu estado hemiacetal e catião flavílio

4.5. Dinâmica Molecular da interação do GLUT1 humano com as antocianinas

Um dos aspetos fundamentais no desenvolvimento de fármacos, é encontrar um composto que se ligue fortemente a uma determinada proteína. Neste caso, para perceber de que forma o transportador de glucose GLUT1 poderá estar envolvido no transporte de antocianinas ao longo da membrana celular, é necessário entender as suas características estruturais e perceber se as antocianinas se ligam de uma forma eficaz ou não. O processo de *docking* molecular é bastante útil para perceber se as probabilidades de ligação são ou não favoráveis. No entanto, apenas dá a informação sobre uma determinada *pose* adotada num sistema inflexível. Não dá informação nenhuma sobre o comportamento do sistema ao longo do tempo. Como tal, é necessário recorrer a outras ferramentas. A dinâmica molecular permite perceber o comportamento de um determinado sistema ao longo do tempo. Assim, é útil neste estudo para analisar a trajetória e o comportamento das antocianinas dentro do GLUT1 ao longo do tempo de simulação.

Resumidamente, foi realizada uma simulação de dinâmica molecular ao longo de 25 ns (nanossegundos) para cada uma das antocianinas na sua forma hemiacetal e catião flavílio. Foram usadas as duas melhores soluções de cada antocianina, com exceção da estrutura hemiacetal da Malvidina-3-glucose uma vez que as duas primeiras soluções eram praticamente iguais (apesar de valores de $\Delta G_{\text{associação}}$ diferentes), utilizando-se apenas uma. Isto resultou num total de 11 simulações de dinâmica molecular.

A análise das simulações de dinâmica molecular (DM) revelou que todas as antocianinas, em ambas as formas estruturais se mantiveram no mesmo local durante o tempo de simulação. Isto sugere que aquela zona cria de facto uma ligação forte e favorável com as antocianinas.

Nos modelos de estudo utilizados nestas simulações de DM não foi incluída a membrana plasmática, por forma a reduzir o custo computacional exigido. No entanto, verificou-se que a estrutura e *folding* globais do recetor GLUT1 se mantiveram durante toda a simulação, o que minimiza o erro incorporado com o uso desta aproximação.

Nos anexos I a XI, encontra-se representada a posição inicial e média de cada composto durante a simulação de dinâmica molecular. Verificou-se que em todas as situações as antocianinas mantiveram-se relativamente estáveis, resultado da posição semelhante para a posição inicial e a posição média. Posteriormente foram realizadas análises complementares como RMSd, RMSF e análise de pontes de hidrogénio para perceber melhor o modo de interação.

4.5.1. Root-Mean-Square deviation (RMSd)

Os valores de RMSd do esqueleto da proteína foram obtidos ao longo de toda a simulação de dinâmica molecular e estão representados nos anexos XII e XIII. O anexo XII representa os valores obtidos para os receptores associados às diferentes antocianinas nas suas formas de catião flavílio, enquanto que o anexo XIII representa os valores dos transportadores de GLUT1 ligados às antocianinas na sua forma hemiacetal.

É possível verificar a partir do anexo XII, algumas diferenças no comportamento do sistema ao longo do tempo de simulação para as diferentes antocianinas.

No início da simulação observa-se um crescimento dos valores que é típico da fase inicial das simulações de dinâmica molecular. A partir dos 4 ns todos os sistemas parecem começar a estabilizar, o que é indicativo de uma interação favorável entre os compostos e o transportador, reforçando as observações das várias dinâmicas. No entanto, existem algumas variações nos valores que só começam a diminuir a partir do 14 ns para a maioria dos complexos.

Analisando entre si, é possível ver que o complexo S1 da delfinidina-3-glucose foi aquele que estabilizou mais rapidamente quando comparado com as outras antocianinas. Isto sugere que a proteína poderá ficar mais facilmente relaxada e preparada para exercer a sua função de transporte quando se trata da ligação com a delfinidina-3-glucose, o que poderá ser explicado pelo maior número de grupos hidroxilo que permitem a formação de um maior número de pontes de hidrogénio.

Por outro lado, o catião menos estável foi, a cianidina-3-glucose, o que pode ser explicado pelo facto de ter menos um substituinte no anel B quando comparado com as outras antocianinas. Apesar de ser pouco evidente, ambas as soluções desta

antocianina (S1 e S2), provocaram no sistema um ligeiro atraso no equilíbrio, que só foi atingido cerca de 20 ns após o início da simulação.

Relativamente à malvidina-3-glucose os resultados para as duas soluções são bastante diferentes. É possível ver que o sistema para o caso da solução 1 (Mv S1) parece estabilizar rapidamente, por volta dos 4 ns, no entanto aos 20 ns verifica-se um aumento dos valores de RMSd para a formação de um novo plateau. No entanto, para a solução 2 (Mv S2) verifica-se uma estabilização por volta dos 5 ns que mantém até ao final da simulação. Isto sugere que as diferentes conformações apesar de o composto ser o mesmo podem também ter influência na estabilização do sistema. Assim, a forma como o ligando entra na proteína, poderá ditar o sucesso ou insucesso da ligação. Por outro a existência deste aumento sugere que a proteína pode adotar pelo menos duas conformações diferentes ao longo da simulação.

Globalmente os complexos formados pelo GLUT e os diferentes catiões foram estabilizados.

Analisando o anexo XIII, é possível observar, à semelhança dos catiões, diferenças nos valores de RMSd dos GLUT1 ligados aos hemiacetais de cada antocianina. No entanto as diferenças são menos significativas de que aquelas encontradas no caso dos catiões. Parece ser a cianidina-3-glucose, a antocianina cujo sistema estabiliza mais rapidamente e por outro lado parece ser a malvidina-3-glucose a menos estável. Os sistemas parecem começar a estabilizar por volta dos 5 ns e mostram-se completamente estabilizados 12 ns após a simulação.

Os valores variam entre 1 e 2,5 Å para ambas as formas estruturais de todas as antocianinas, sugerindo que no geral os movimentos da proteína se vão mantendo mais ou menos semelhantes independentemente da antocianina que está ligada.

4.5.2. Root-Mean-Square Fluctuation (RMSF)

Com o objetivo de analisar quais as zonas do transportador de glucose com mais movimento foi realizada uma análise de RMSF para cada uma das soluções (S1 e S2) de ambas as formas estruturais das antocianinas.

A figura 33 representa os valores de RMSF para os receptores GLUT1 associados às antocianinas na forma de catião flavílio, enquanto que a figura 34 representa os valores de RMSF para as estruturas hemiacetais.

É possível verificar pela análise da figura 33 que o perfil de RMSF é semelhante para todos os complexos, o que indica que a ligação das diferentes antocianinas não influenciou significativamente o movimento dos aminoácidos ao longo da simulação.

É possível verificar que existem várias zonas na proteína que são mais flexíveis, resultado em valores de RMSF superiores. Estas zonas encontram-se representadas na figura 34.

Como seria de esperar, as zonas mais flexíveis encontram-se no exterior do transportador, pois estão expostas ao solvente, permitindo adotar conformações diferentes para permitir a entrada e saída dos ligandos.

A figura 33, mostra que o local de ligação das antocianinas não é afetado por esta flexibilidade de flutuações o que poderá indicar uma ligação forte por parte destes compostos na interação com o transportador GLUT1 humano.

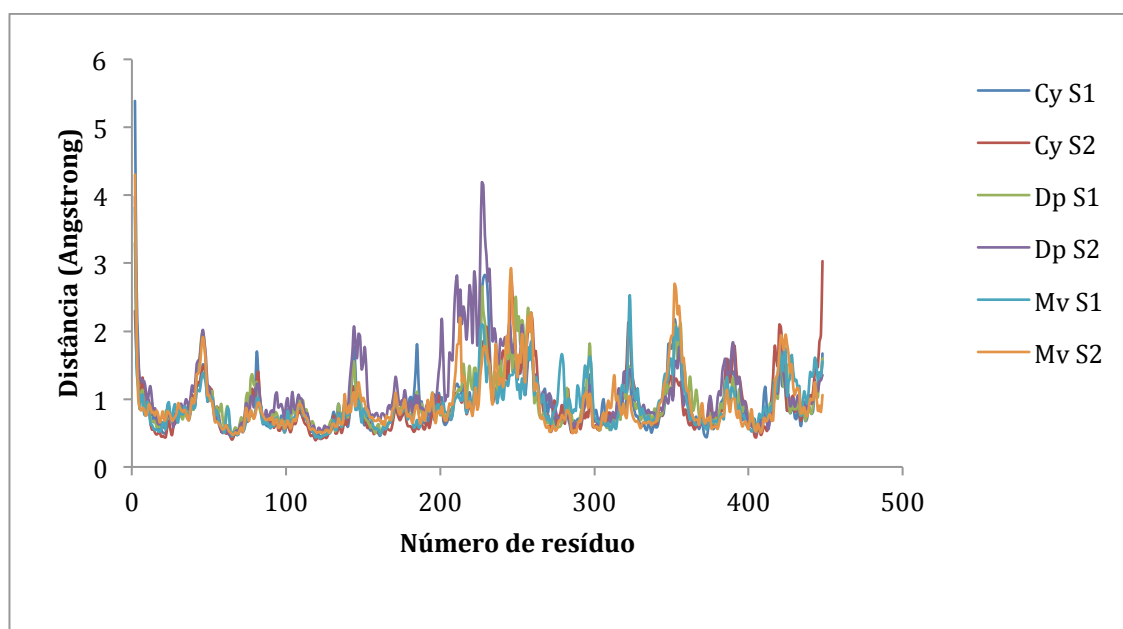


Figura 33. Valores de RMSF para o GLUT1 humano (4PYP) complexado com cianidina-3-glucose, delphinidina-3-glucose e malvidina-3-glucose na forma de catião flavílio. S1 e S2 representam as duas melhores soluções obtidas pelo *docking* molecular.

Olhando agora para os resultados obtidos no caso da complexação com as antocianinas na sua forma hemiacetal (figura 35) é possível verificar um comportamento muito semelhante ao do caso dos cátions flavílio nas flutuações do sistema.

Isto é indicativo de que o transportador terá um movimento natural que lhe permitirá fazer o transporte dos compostos de uma forma sistematizada. No entanto, é interessante notar, tanto na figura 32 como na 34, ligeiras diferenças na flexibilidade dos resíduos dependendo do tipo de antocianina que está ligada e da sua conformação, mesmo que no global o perfil seja semelhante. Isto poderá sugerir, que apesar de um mecanismo sistemático, o ligando poderá ter influências ligeiras na conformação da proteína de modo a tornar o processo eficaz. Poderá ser uma forma de adaptação do transportador ao ligando.

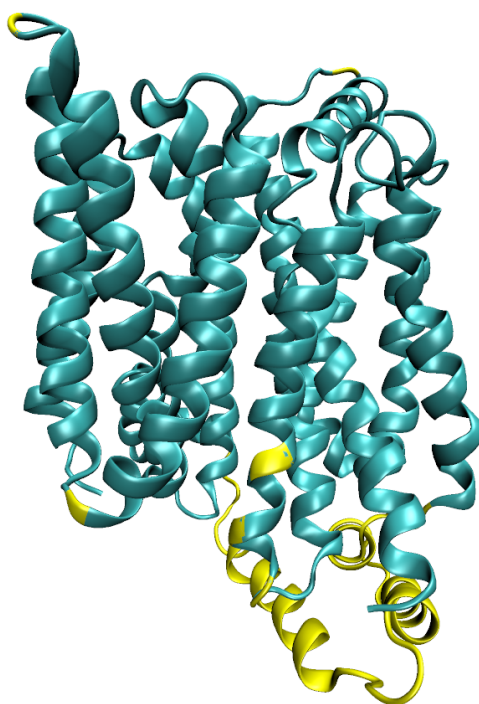


Figura 34. Representação dos resíduos do GLUT1 humano (4PYP) com valores de RMSF mais elevados (a amarelo).

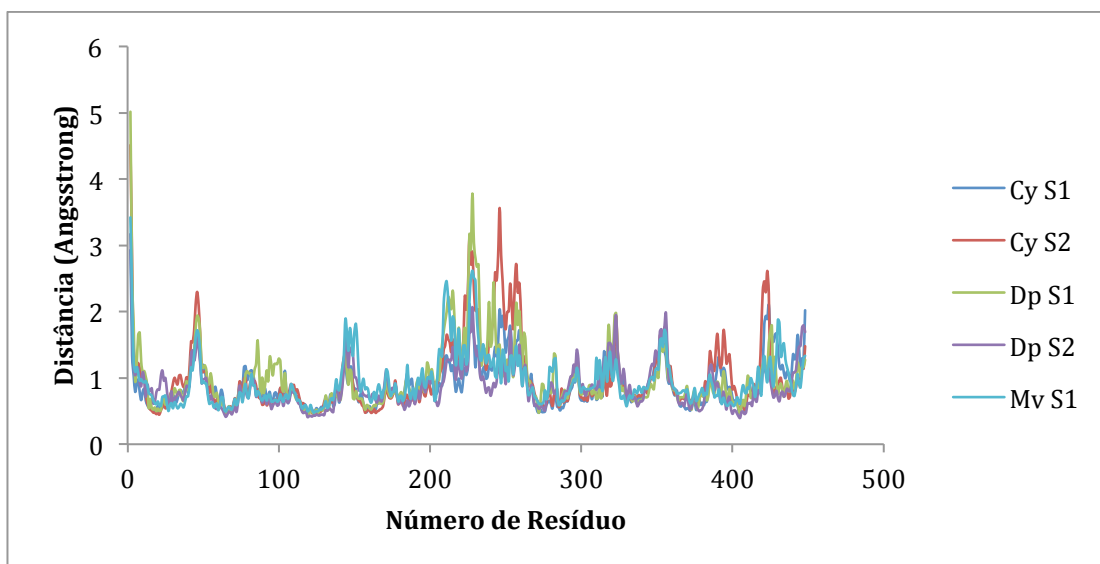


Figura 35. Valores de RMSF para o GLUT1 humano (4PYP) complexado com cianidina-3-glucose, delphinidina-3-glucose e malvidina-3-glucose na forma hemiacetal. S1 e S2 representam as duas melhores soluções obtidas pelo *docking* molecular.

Assim, a figura 34 é também representativa das zonas mais flexíveis do GLUT1 complexado com as diferentes antocianinas na sua forma hemiacetal.

É interessante verificar que apenas um dos lados do transportador se mostrar com uma flexibilidade elevada. Esta observação faz sentido uma vez que a conformação do GLUT1 desta estrutura cristalográfica apenas tem um dos lados abertos (abertura para o citoplasma), o que faz com que o lado fechado tenha uma rigidez mais acentuada. Apesar disso é possível ver alguns resíduos do lado fechado com a flexibilidade típica da exposição ao solvente.

4.5.3. Análise das interações proteína-ligando

Foi realizada uma análise das pontes de hidrogénio formadas entre os resíduos da proteína e cada uma das antocianinas nas formas catião flavílio e hemiacetal. A formação de pontes de hidrogénio é uma das interações mais importantes na ligação entre um ligando e uma proteína. Uma vez que as antocianinas possuem anéis aromáticos, e tal como já foi demonstrado (figura 31), o local de ligação das antocianinas possui resíduos de aminoácidos com anéis, fez-se a análise de possíveis efeitos de *stacking* (interações π - π).

As tabelas 7 e 8 mostram as pontes de hidrogénio formadas entre o catião da cianidina-3-glucose nas melhores conformações e o GLUT1 humano.

Como se pode verificar, os resíduos mais importantes, são o Glu372, Gln153 e Asn407. O resíduo de glutamato utiliza em ambas as situações o resíduo de glucose para efetuar a ponte de hidrogénio que se mantem durante mais tempo para ambos os casos. Para além disso são ainda contactos hidrofóbicos com vários resíduos de aminoácidos. Este fenómeno promove a estabilidade do ligando, tornando a ligação mais estável.

As tabelas 9 e 10, mostram as pontes de hidrogénio que se formam quando o catião da delfinidina-3-glucose se liga ao transportador.

Os resíduos que desempenham um papel essencial na ligação, são o Glu372, Asn309 e Asn403. Tal como no caso anterior, o glutamato liga-se à glucose, através do grupo hidroxilo do carbono 6. Também na conformação S2 existe um resíduo de asparagina (Asn309) que mantem uma ligação ao grupo hidroxilo do carbono 4 durante a maior parte do tempo. Uma vez mais as interações hidrofóbicas de *stacking* estão bem presentes entre os resíduos de Triptofano, Fenilalanina e Histidina no local de ligação do transportador e os anéis AC e B desta antocianina, fortalecendo a ligação.

Tabela 7. Pontes de hidrogénio formadas entre o catião da cianidina-3-glucose (S1) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.

Dador	Aceitador	% ocupação	Distância (desvpad)
Glu372-O	Gluc-C6-OH	79,90 %	2,618 (0,10)
Gln153-O	C5'-OH	78,08 %	2,762 (0,12)
Thr22-O	C7-OH	55,71 %	2,691 (0,10)
Gluc-C2-O	Asn403-OH	38,01 %	2,894 (0,07)
Gluc-C4-O	Trp380-NH	29,36 %	2,867 (0,08)
C5-O	Gln275-NH	27,75 %	2,873 (0,08)
Gluc-C3-O	Trp380-NH	26,91 %	2,878 (0,08)
Glu372-O	Gluc-C6-OH	19,98 %	2,660 (0,11)
C5-O	Tyr284-OH	7,30 %	2,872 (0,09)
Phe283-Anel B Phe371-Anel B His152-Gluc Trp380-Gluc Trp404-Anel		Interação π - π Interação π - π Interação π - CH Interação π - CH Interação π - π	

Tabela 8. Pontes de hidrogénio formadas entre o catião da cianidina-3-glucose (S2) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.

Dador	Aceitador	% ocupação	Distância (desvpad)
Glu372-O	Gluc-C4-OH	82,77 %	2,706 (0,14)
Glu372-O	Gluc-C3-OH	74,32 %	2,642 (0,12)
Asn407-O	C7-OH	62,79 %	2,729 (0,12)
Glu372-O	Gluc-C4-OH	47,62%	2,764 (0,13)
C7-O	Tyr284-OH	34,69 %	2,829 (0,10)
Glu372-O	Glu-C3-OH	32,18 %	2,664 (0,14)
Gluc-C4-O	Gln153-NH	27,96 %	2,885 (0,08)
C3-O	Gln274-NH	25,82 %	2,890 (0,07)
Gluc-O	Gln274-NH	21,03 %	2,900 (0,07)
Tyr284-O	C7-OH	20,15%	2,787 (0,11)
C5-O	Gln275-NH	7,97 %	2,915 (0,06)
Gln153-O	Gluc-C6-OH	6,78 %	2,690 (0,12)
Trp404-Anel B Trp380- Anel B Phe371-Gluc His152-Gluc			Interação π- π Interação π- π Interação π- CH Interação π- CH

Tabela 9. Pontes de hidrogénio formadas entre o catião da delfinidina-3-glucose (S1) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.

Dador	Aceitador	% ocupação	Distância (desvpad)
Glu372-O	Gluc-C6-OH	98,73 %	2,653 (0,11)
Asn403-O	C7-OH	32,98 %	2,682 (0,11)
Asn407-O	C7-OH	25,46 %	2,758 (0,12)
Ser65-O	C7-OH	12,06 %	2,804 (0,10)
Gluc-O	Gln274-NH	8,04 %	2,919 (0,06)
C5'-O	Asn280-NH	7,72 %	2,882 (0,08)
Phe283-Anel B Phe371-Anel B His152-Gluc Trp380-Gluc Phe64- Anel AC Trp404-Anel AC			Interação π- π Interação π- π Interação π- CH Interação π- CH Interação π- π Interação π- π

Tabela 10. Pontes de hidrogénio formadas entre o catião da delfinidina-3-glucose (S2) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.

Dador	Aceitador	% ocupação	Distância (desvpad)
Glu372-O	Gluc-C6-OH	91,25 %	2,580 (0,09)
Asn309-O	Gluc-C4-OH	89,09 %	2,688 (0,11)
Gluc-C6-O	Asn309-NH	70,31 %	2,863 (0,08)
Gluc-C2-O	Gln275-NH	27,48 %	2,889 (0,08)
Asn309-O	Glu-C6-OH	8,59 %	2,685 (0,11)
Trp404-Anel AC	Interação π - π		
Trp380-Anel AC	Interação π - π		
Phe371-Anel B	Interação π - π		
Phe283-Anel B	Interação π - π		

Os resíduos que parecem ser mais importantes no caso do catião da malvidina-3-glucose, são a Asn280, a Tyr284 e o Trp380 (tabelas 11 e 12). É também possível verificar a existência de algumas interações de hidrofóbicas. Neste caso parece ser o grupo hidroxilo do carbono 5 da estrutura (anel A) que tem a maior importância na ligação ao transportador, no entanto, analisando toda a tabela verifica-se também, mais uma vez a importância da glucose.

Tabela 11. Pontes de hidrogénio formadas entre o catião da malvidina-3-glucose (S1) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.

Dador	Aceitador	% ocupação	Distância (desvpad)
Asn280-O	C5-OH	95,84 %	2,690 (0,12)
Gluc-C2-O	Trp380-NH	69,73 %	2,863 (0,09)
Gluc-C2-O	Gln274-NH	68,17 %	2,836 (0,08)
Glu372-O	Gluc-C4-OH	63,75 %	2,602 (0,10)
Glu372-O	Gluc-C3-OH	61,45 %	2,660 (0,13)
Glu372-O	Gluc-C3-OH	50,72 %	2,681 (0,14)
Glu372-O	Gluc-C4-OH	34,95 %	2,611 (0,10)
C5-O	Gln275-NH	29,48 %	2,897 (0,07)
Gluc-C4-O	Asn309-NH	21,73 %	2,904 (0,07)
C7-O	Tyr284-OH	16,93 %	2,822 (0,10)
Phe371-Gluc	Interação π - CH		
Trp380-Anel B	Interação π - π		
Trp404-Anel AC	Interação π - π		
Phe64-Anel AC	Interação π - π		

Tabela 12. Pontes de hidrogénio formadas entre o catião da malvidina-3-glucose (S2) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.

Dador	Aceitador	% ocupação	Distância (desvpad)
Tyr284-O	C5-OH	85,01 %	2,794 (0,11)
Glu372-O	Gluc-C3-OH	60,20 %	2,612 (0,12)
Glu372-O	Gluc-C3-OH	45,63 %	2,610 (0,12)
Phe283-O	Gluc-C6-OH	33,88 %	2,800 (0,11)
C5-O	Trp380-NH	21,89 %	2,903 (0,07)
Thr22-O	Gluc-C6-OH	19,80 %	2,812 (0,11)
Asn309-O	Gluc-C4-OH	15,50 %	2,757 (0,12)
Gluc-C3-O	Asn309-NH	14,44 %	2,832 (0,08)
Gluc-C3-O	Asn309-NH	7,41 %	2,876 (0,08)
Trp404-Anel AC His152-Anel B		Interação π - π Interação π - π	

Tabela 13. Pontes de hidrogénio formadas entre o hemiacetal da cianidina-3-glucose (Se) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.

Dador	Aceitador	% ocupação	Distância (desvpad)
Glu372-O	C4'-OH	99,97 %	2,554 (0,08)
Glu372-O	C5'-OH	99,25 %	2,624 (0,10)
Glu372-O	Gluc-C6-OH	92,04 %	2,689 (0,12)
Gluc-C2-O	Trp380-NH	65,97 %	2,871 (0,08)
Thr22-O	C7-OH	61,48 %	2,749 (0,11)
C4'-O	Asn309-NH	46,23 %	2,891 (0,07)
Gluc-C2-O	Gln274-NH	42,25 %	2,890 (0,07)
C2-O	Asn280-NH	31,18 %	2,898 (0,07)
C7-O	Thr22-OH	17,95 %	2,815 (0,10)
C7-O	Tyr284-OH	10,11 %	2,868 (0,09)
Glu372-O	Gluc-C6-OH	9,66 %	2,808 (0,12)
Asn280-O	C2-OH	8,44 %	2,749 (0,11)
Gln153-O	Guc-C4-OH	7,24 %	2,848 (0,10)
C5-O	Gln275-NH	6,51 %	2,904 (0,07)
Phe283-Anel B Phe371-Anel B Trp380-Gluc Phe64-Anel AC Trp404-Anel AC		Interação π - π Interação π - π Interação π - CH Interação π - π Interação π - π	

Tabela 14. Pontes de hidrogénio formadas entre o hemiacetal da cianidina-3-glucose (S2) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.

Dador	Aceitador	% Ocupação	Distância (desvpad)
Glu372-O	Gluc-C3-OH	85,62 %	2,574 (0,09)
Glu372-O	Gluc-C4-OH	83,70 %	2,658 (0,11)
Ile279-O	C5-OH	81,04 %	2,754 (0,12)
Asn280-O	C7-OH	71,20 %	2,744 (0,11)
Asn403-O	C5'-OH	23,40 %	2,732 (0,12)
Glu372-O	Gluc-C4-OH	19,38 %	2,694 (0,14)
Glu372-O	Gluc-C3-OH	15,40 %	2,609 (0,11)
C5-O	Gln275-NH	13,27 %	2,907 (0,07)
Asn280-O	C5-OH	8,08 %	2,706 (0,11)
Gluc-C6-O	Trp380-NH	7,57 %	2,893 (0,07)
Thr22-O	C7-OH	6,07 %	2,782 (0,11)
Asn403-O	C5'-OH	5,18 %	2,850 (0,11)
Phe64-Anel AC		Interação π - π	
Trp404-Anel AC		Interação π - π	
Trp380-Gluc		Interação π - π	

Tabela 15. Pontes de hidrogénio formadas entre o hemiacetal da delfinidina-3-glucose (S1) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.

Dador	Aceitador	% Ocupação	Distância (desvpad)
Thr22-O	C7-OH	79,45 %	2,760 (0,11)
Glu372-O	C4'-OH	66,66 %	2,631 (0,10)
Glu372-O	C3'-OH	65,76 %	2,655 (0,11)
Gln274-O	Gluc-C2-OH	51,25 %	2,631 (0,10)
C7-O	Gln275-NH	35,23 %	2,867 (0,08)
Gluc-C2-O	Trp380-NH	20,21 %	2,896 (0,07)
Asn309- O	C3'-OH	19,72 %	2,768 (0,11)
Asn280-O	C2-OH	18,93 %	2,766 (0,12)
Asn309-O	C4'-OH	18,07 %	2,725 (0,11)
Glu372-O	C4'-OH	17,58 %	2,715 (0,16)
C7-O	Tyr284-OH	15,65 %	2,854 (0,10)
Gluc-C4-O	Gln153-NH	14,51 %	2,858 (0,08)
Asn403-O	C5-OH	12,72 %	2,678 (0,11)
Glu372-O	C3'-OH	10,35 %	2,657 (0,11)
C2-O	Gln275-NH	7,60 %	2,899 (0,07)
Gluc-C3-O	Trp380-NH	6,66 %	2,886 (0,08)
Gluc-C4-OH	Gln153-NH	5,53 %	2,867 (0,08)

Phe283-Anel B	Interação π - π
Phe371-Anel B	Interação π - π
Phe64- Anel AC	Interação π - π
Trp404-Anel AC	Interação π - π

Tabela 16. Pontes de hidrogénio formadas entre o hemiacetal da delfinidina-3-glucose (S2) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.

Dador	Aceitador	% Ocupação	Distância (desvpad)
Glu372-O	C4'-OH	97,50 %	2,629 (0,10)
Glu372-O	C3'-OH	97,49%	2,607 (0,10)
Asn403-O	C5-OH	92,09 %	2,707 (0,11)
Asn280-O	Gluc-C2-OH	87,11 %	2,710 (0,12)
Thr129-O	C7-OH	75,65 %	2,793 (0,12)
Asn280-O	Gluc-C3-OH	43,11 %	2,749 (0,12)
Gluc-C2-O	Gln275-NH	39,65 %	2,878 (0,09)
Phe283-O	Gluc-C3-OH	14,14 %	2,760 (0,12)
C7'-O	Trp380-NH	14,05 %	2,885 (0,10)
Gly376-O	C7'-OH	8,21 %	2,820 (0,10)
Asn280-O	Gluc-C3-OH	6,28 %	2,826 (0,11)
Phe283-Gluc	Interação π - π		
Trp404-Anel AC	Interação π - π		
Trp380-Anel AC	Interação π - π		

Tabela 17. Pontes de hidrogénio formadas entre o hemiacetal da malvidina-3-glucose (S1) e o GLUT1 humano. Estão representados os átomos dadores e os átomos aceitadores de cada interveniente, juntamente com a percentagem de tempo que a ligação se dá e a distância média em Å.

Dador	Aceitador	% Ocupação	Distância (desvpad)
Gln274-O	C2-OH	67,13 %	2,770 (0,12)
Glu372-O	Gluc-C4-OH	66,98 %	2,580 (0,09)
Glu372-O	Gluc-C6-OH	65,88 %	2,670 (0,12)
C5'-O	Gln275-NH	39,23 %	2,882 (0,08)
Ser15- O	C5-OH	36,43 %	2,842 (0,10)
Glu372-O	Gluc-C6-OH	35,35 %	2,687 (0,07)
Glu372-O	Gluc-C4-OH	32,83 %	2,605 (0,08)
C2-O	Gln274-NH	33,51 %	2,895 (0,10)
Asn309-O	Gluc-C4-OH	30,78 %	2,818 (0,11)
C2-O	Trp380-NH	29,46 %	2,900 (0,07)
His152-O	C7-OH	22,49 %	2,719 (0,12)
C4'-O	Asn407-NH	21,31 %	2,897 (0,07)

Gluc-C1-O	Gln152-NH	19,12 %	2,890 (0,08)
C2-O	Trp380-NH	13,92 %	2,878 (0,12)
Asn403-O	C2-OH	7,19 %	2,785 (0,12)
Trp404-Anel B		Interação π - π	
Trp380-Anel AC		Interação π - π	
Phe371-Gluc		Interação π - π	
Phe283-Gluc		Interação π - π	

Nas tabelas 13 e 14 é possível ver os resultados obtidos para o complexo entre a forma hemiacetal da cianidina-3-glucose e o transportador. É possível concluir que o Glu372 é, uma vez mais o resíduo que mais parece influenciar a ligação da antocianina. Para além deste também o Trp380 e a Thr22 estão envolvidos nas ligações que se mantêm durante mais tempo. Parece ser o resíduo de glucose e o anel B a terem um papel importante neste caso.

O efeito de *stacking* entre os resíduos aromáticos do local de ligação e os anéis dos compostos demonstra ter um papel importante também neste caso.

Nas tabelas 15 e 16, por sua vez, são apresentadas as pontes de hidrogénio formadas pela forma hemiacetal da delphinidina-3-glucose com o GLUT1. Resíduos como a Thr22, Glu372 e Asn403, mostraram ter um papel importante na ligação. De novo, o efeito de *stacking* está bem presente, sendo os resíduos mais importantes neste contacto a Phe283, Trp404 e Trp380.

Por fim, a tabela 17 mostra os resultados correspondentes à ligação da forma hemiacetal da malvidina-3-glucose na proteína em estudo. Os resíduos são envolvidos nas principais ligações são semelhantes aos envolvidos nos casos anteriores e o efeito de *stacking* encontra-se evidenciado novamente.

Da análise geral destes resultados, podemos tirar várias conclusões. Os resíduos principais envolvidos nas ligações que formam as pontes de hidrogénio mantêm-se conservados (Thr22, Glu372, Asn403, Gln274, Asn280, ...). A forma como o composto é captado pela proteína influencia a força das ligações. O efeito de *stacking* está presente em todos os locais de ligação através, principalmente, dos anéis aromáticos dos resíduos de triptofano e fenilalanina.

O efeito de *stacking* promove a estabilização dos compostos através de interações π - π formadas entre anéis que se encontrem paralelos ou perpendiculares. O facto de o local de ligação ser rico em aminoácidos com anéis aromáticos (Phe e Trp)

parece favorecer a estabilidade das antocianinas, uma vez que estas também contêm anéis na sua estrutura. Isto pode ser uma das razões pela qual o local em causa é preferencial.

Fazendo uma comparação entre todas as antocianinas é possível verificar diferenças na formação e intensidade das pontes de hidrogénio.

No caso dos catiões é possível verificar que a cianidina-3-glucose é a antocianina com maior número de pontes de hidrogénio efetuadas. Apesar de tanto para a delphinidina-3-glucose como para malvidina-3-glucose, existirem ligações com uma força maior (traduzidas numa maior % de ocupação ou menor comprimento), não significa que sejam estas antocianinas cuja ligação é mais estável. A cy-3-glc vai formando pequenas pontes durante períodos de tempo pequenos, que no seu conjunto poderão atribuir uma estabilidade superior quando comparada com as outras antocianinas.

O resíduo Glu372 parece ter um papel essencial na ligação dos catiões e dos hemiacetais à proteína. Considerando os substituintes das antocianinas, parece ser o resíduo de glucose o mais importante nesta interação. Estes resultados sugerem que tanto o catião como o hemiacetal poderão ser atraídos para o interior do transportador possivelmente graças ao resíduo de glucose que faz parte da sua estrutura. Este resultado reforça os resultados obtidos no capítulo I deste trabalho.

Relativamente aos hemicetais pode verificar-se que o padrão seguido é mais ou menos semelhante ao padrão dos catiões. Neste caso o número de ligações em todos os casos é superior quando comparados com os catiões, o que pode ser explicado pelo facto de existir um grupo hidroxilo no carbono 2 adicional, num plano perpendicular, que permite a formação de mais pontes de hidrogénio.

Mais uma vez o resíduo de Glu372 (figura 36) mostra ser essencial, sugerindo que este poderá ser um dos principais resíduos envolvidos no mecanismo do sistema de transporte deste tipo de transportadores.

Também na figura 36 é destacada a hélice que contém o resíduo Glu372, e interessantemente é a hélice α homóloga do transportador de açúcares bacteriano XylE que foi descrita que sendo responsável pelo mecanismo de transporte deste (Sun *et al.* 2012).

É possível ainda verificar que as distâncias das pontes de hidrogénio se mantêm mais ou menos constantes para todas as antocianinas, realçando a elevada estabilidade do modo de ligação.

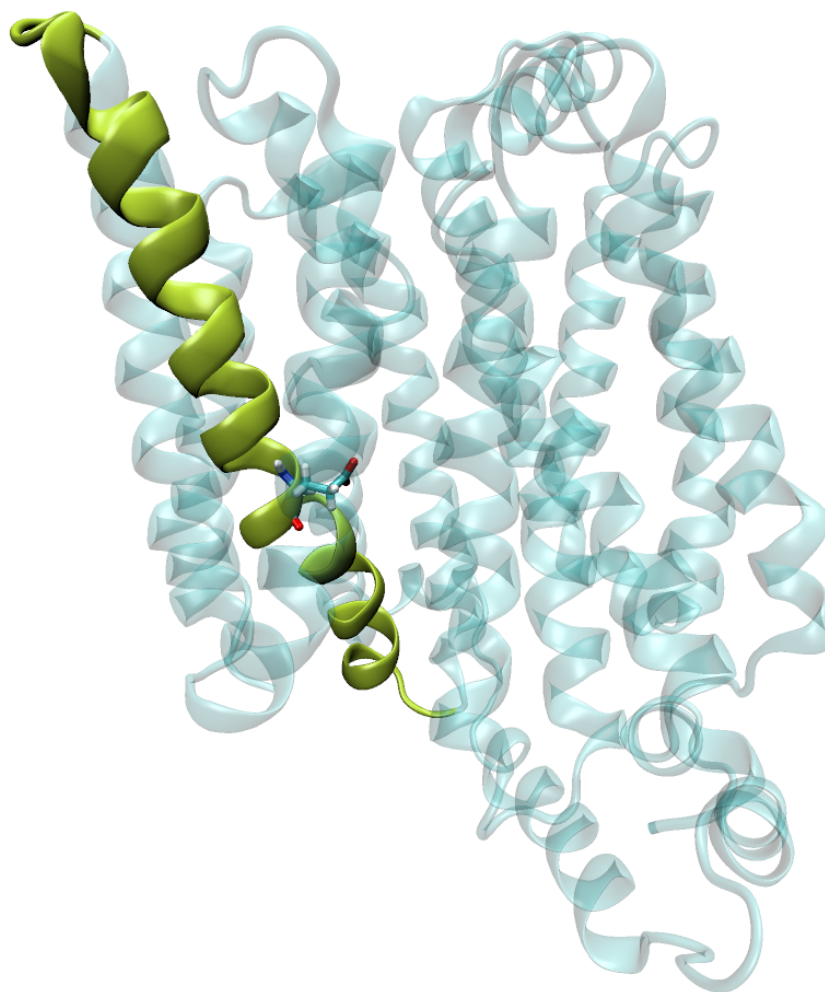


Figura 36. Destaque do resíduo Glu372 e da hélice α TM7 (Sun *et al.* 2012) (a amarelo) do transportador de glucose humano GLUT1 (4PYP)

4.5.4. Hidratação do local de ligação das antocianinas

Foi feita uma análise para verificar o número médio de águas em cada caso ao longo da simulação de dinâmica molecular. Os resultados estão apresentados nas tabelas 18 e 19.

Tabela 18. Número médio de águas presentes no local de ligação à distância de 3 Å e entre 3 e 5 Å para as formas catião flavílio das respetivas antocianinas.

Complexo	Até 3 Å	Entre 3 e 5 Å
Cy S1	9	12
Cy S2	5	10
Dp S1	6	8
Dp S2	4	5
Mv S1	9	12
Mv S2	5	8

Tabela 19. Número médio de águas presentes no local de ligação à distância de 3 Å e entre 3 e 5 Å para as formas hemiacetal das respetivas antocianinas.

Complexo	Até 3 Å	Entre 3 e 5 Å
Cy S1	7	11
Cy S2	5	10
Dp S1	8	10
Dp S2	2	5
Mv S1	4	6

Como é possível verificar o local de ligação é consideravelmente hidratado para todas as antocianinas, o que seria de esperar uma vez que estas são bastante solúveis. Este facto sugere que a solubilização poderá ser importante para ajudar na acomodação e estabilização das antocianinas no local de ligação do GLUT1. Podemos ver também comparando as duas formas estruturais que os catiões possuem um número de águas ligeiramente superior aos hemiacetais, o que pode ser explicado pela existência da carga positiva no anel C.

Estes resultados mostram que as antocianinas são de facto capazes de entrar no transportador de glucose e conseguem manter-se com uma ligação estável. O facto de os locais de ligação revelados pelo *docking* molecular tanto no homólogo bacteriano XylE aberto para a matriz extracelular como no GLUT1 humano aberto para o citoplasma (figura 37) serem semelhantes, no caso da glucose, e próximos no caso das antocianinas, sugere que o local de ancoramento dos compostos é conservado e gera uma mudança de conformação para permitir que estes sejam transportados para o outro lado da membrana.

Os resíduos mais importantes no GLUT1 na ligação das antocianinas parecem ser o Glu372, as Asn403, 407 e 309, a Tyr284 e a Thr22, que são aminoácidos polares, provocando uma polarização elevada no local, que promove uma distribuição atómica estável para compostos polares como é o caso das antocianinas.

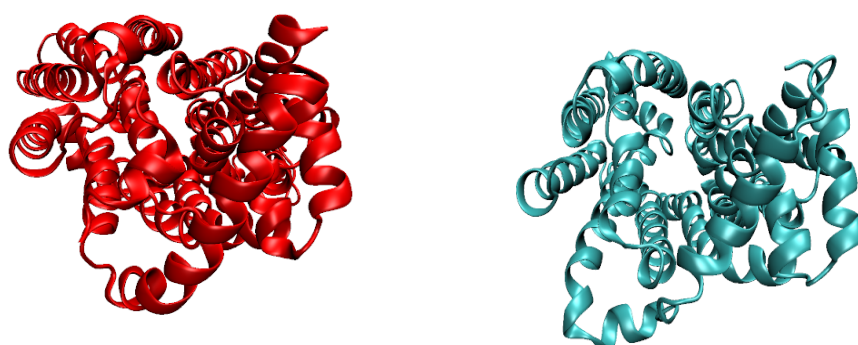


Figura 37. Conformações aberta e fechada da XylE (4GBZ) e do GLUT1 humano (4PYP) para o citoplasma. A vermelho está representado o homólogo XylE e a verde o GLUT1 humano.

Os resultados obtidos neste estudo permitem afirmar que ambas as formas ligam de uma maneira eficiente ao GLUT1, o que pode reforçar os resultados obtidos no capítulo I. No entanto, as diferenças entre eles são pouco significativas.

Foi proposto um mecanismo para o funcionamento do GLUT1 humano (Deng *et al.* 2014) que reporta uma das hélices responsáveis pelo mecanismo de funcionamento do transportador é a hélice onde se encontra o resíduo que mostrou ser mais importante na ligação das antocianinas neste estudo (Glu372), o que reforça a

importância deste resultado, sugerindo uma conservação do mecanismo neste tipo de transportadores.

Os resultados mostraram também que um dos resíduos mais importantes para a ligação, nas antocianinas, foi o resíduo de glucose. Isto era de se esperar uma vez que o transportador é especializado no transporte de glucose, reforçando assim os resultados obtidos experimentalmente e sugerindo o papel da glucose neste transporte. Assim, a glucose poderá ser a principal causa das antocianinas serem preferencialmente transportadas por esta via. Este resultado não está, no entanto, totalmente de acordo com os resultados obtidos no estudo de *docking* molecular. É preciso ter em conta que o *docking* é um processo com uma precisão menor e que serve apenas para dar informação sobre o local de docking. Uma vez que gera poses aleatórias e estáticas que se encaixam no local de ligação favoravelmente pode induzir em erro acerca dos resíduos mais importantes na ligação.

CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os polifenóis constituem, cada vez mais, um dos grupos de compostos naturais com maior potencial terapêutico. Em particular, as antocianinas têm-se revelado como nutracêuticos potencialmente benéficos em determinadas situações patológicas.

O conhecimento acerca do modo exato de ação dos compostos antociânicos torna-se assim um desafio cada vez mais interessante e aliciante.

Este trabalho consistiu, numa primeira fase, numa abordagem mais geral no âmbito da absorção das antocianinas ao nível do estômago. Considerando a ingestão destes compostos por via oral, durante as refeições, será na cavidade gástrica que vão permanecer durante mais tempo. Assim, faria todo o sentido analisar esta zona específica do trato gastrointestinal.

Observou-se que diversos fatores externos influenciaram o transporte das antocianinas, o que sugere uma variação considerável na absorção destas dependente de diversas condições.

Para todos os fatores testados estes mostraram ter um efeito positivo na absorção das antocianinas, com exceção da glucose.

Estes resultados podem elucidar acerca de escolhas e melhoramento de hábitos alimentares numa perspetiva nutracêutica.

Usar estes dados para conjugar as melhores condições de alimentação de forma a potenciar o transporte das antocianinas, representa uma mais valia para a bioatividade destes compostos.

Verificou-se que tal como em outros órgãos a glucose tem um papel fundamental no transporte das antocianinas, reforçando o papel dos transportadores de glucose (Faria *et al.* 2009). Ainda assim, é importante não esquecer que existem inúmeras vias disponíveis que não devem ser descartadas. Um exemplo disto é a bilitranslocase já referenciada no estômago como envolvida no transporte de antocianinas isoladas (Passamonti *et al.* 2003).

Na segunda parte do trabalho, fez-se um estudo mais particular de acordo com os resultados obtidos para primeira parte.

A química/ bioquímica computacional, hoje em dia, revela-se como uma ferramenta imprescindível para quem quer compreender mecanismos moleculares. É um apoio na investigação que ninguém dispensa.

Segundo os resultados obtidos no capítulo I, parece ser o sistema de transportadores envolvidos no transporte de glucose, o principal sistema a transportar as antocianinas. Assim, fez-se o estudo da interação das antocianinas com um transportador de glucose tipicamente presente nas células epiteliais, o GLUT1.

Foram escolhidas 3 antocianinas presentes não só no vinho mas também na grande maioria das fontes alimentares, a cianidina-3-glucose, a delphinidina-3-glucose e a malvidina-3-glucose.

Os resultados obtidos a partir dos estudos computacionais permitiram concluir que as antocianinas formam de facto complexos estáveis com o GLUT1.

Mais ainda, mostraram que é possível a formação de uma ligação forte nas duas formas testadas, catião flavílio e hemiacetal.

Foram obtidas informações acerca do mecanismo de funcionamento do transporte que sugere uma conservação do centro ativo para os diferentes compostos que este transportador poderá carregar.

Este trabalho permitiu aprofundar o conhecimento acerca do transporte de antocianinas ao nível do estômago, contribuindo assim para o aumento da base científica neste campo, uma vez que até à data toda a informação existente era muito controversa.

É de uma importância elevada continuar a fazer investigação de ponta nesta área. Como perspectivas futuras será interessante investigar o efeito de diferentes fatores, mais específicos para determinadas funções celulares de modo a elucidar melhor sobre os potenciais mecanismos envolvidos no transporte das antocianinas. Analisar diferentes transportadores a nível computacional e caracterizar a sua interação com as antocianinas, à semelhança do que foi feito neste estudo com o GLUT1. Utilizar diferentes linhas celulares de órgãos distintos fazendo estudos na mesmas condições, sempre que possível, para tentar obter padrões de comportamento.

Ficar com uma livreria de conhecimento acerca da bioatividade das antocianinas desde a sua absorção aos locais onde atuam, como atuam, como são absorvidas, será certamente uma mais valia a vários níveis.

Quem sabe se não estará nestes compostos a derradeira solução para diversos problemas patológicos que são enfrentados todos os dias ainda sem perspectivas de erradicação total à vista.

BIBLIOGRAFIA

- Andersen, Ø. M. and Jordheim, M. (2006). "The anthocyanins." In Ø. M. Andersen & K. R. Markham (Eds.), *Flavonoids* (2nd ed.. Chemistry, biochemistry and applications, pp. 452–471). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Andlauer, W., Stumpf, C., et al. (2003). "Absorption and metabolism of anthocyanin cyanidin-3-glucoside in the isolated rat small intestine is not influenced by ethanol." *Eur. J. Nutr.* 42, 217–223.
- Andres-Lacueva, C., B. Shukitt-Hale, et al. (2005). "Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory." *Nutr. Neurosci.* 8(2): 111-120.
- Aviram, M. and B. Fuhrman (2002). "Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957: 146-161.
- Battiston, L., A. Macagno, et al. (1999). "Specific sequence-directed anti- bilirubin-binding proteins in different tissues of the rat." *FEBS Lett.*, 453, 351–355.
- Bayly, C. I., C. Cieplak, et al. (1993). "A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges – the resp model." *J. Phys. Chem.*, 97, 10269–10280.
- Bei, R., L. Masuelli, et al. (2009). "Impaired expression and function of signaling pathway enzymes by anthocyanins: role on cancer prevention and progression." *Curr. Enz. Inhib.* 4(5): 184-197.
- Bonvehi, J. S. and F. V. Coll (1997). "Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder." *Food Chem.* 60: 365-370.
- Bornsek SM, Ziberna L, (2012) . "Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells." *Food Chem* **134**:1878–84.
- Bors, W., W. Heller, et al. (1990). "Radical chemistry of flavonoid antioxidants." *Adv. Exp. Med. Biol.* 264: 165-170.
- Boudet, A.-M. (2007). "Evolution and current status of research in phenolic compounds." *Phytochemistry* 68(22–24): 2722-2735.
- Boulton, R. (2001). "The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review." *American J. of Enol. and Vit.*, 52, 67–87.

- Bowen-Forbes, C. S., Y. Zhang, et al. (2010). "Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits." *J. Food Comp. Anal.* 23, 554-560.
- Brouillard, R. (1983). "The in vivo expression of anthocyanin colour in plants." *Phytochemistry* 22(6): 1311- 1323.
- Brouillard, R. and A. Cheminat (1988). "Flavonoids and plant color." *Prog. Clin. Biol. Res.* 280: 93-106.
- Bub, A., B. Watzl, et al. (2001). "Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice." *Eur. J. Nutr.* 40(3): 113-120.
- Byers, J. P. and J. G. Sarver (2009). *Pharmacokinetic Modeling. Pharmacology: Principles and practice.*
- Cao, G. and R. L. Prior (1999). "Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract." *Clin. Chem.* 45(4): 574-576.
- Cao, G., E. Sofic, et al. (1997). "Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships." *Free Radic. Biol. Med.* 22(5): 749-760.
- Cao, G., H. U. Muccitelli, et al. (2001). "Anthocyanins are absorbed in glyated forms in elderly women: a pharmacokinetic study." *Am. J. Clin. Nutr.* 73(5): 920-926.
- Cao, G., R. M. Russell, et al. (1998). "Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women." *J. Nutr.* 128(12): 2383-2390.
- Case, D. A., T. A. Darden., et al. (2008). *AMBER 10.* San Francisco: University of California.
- Castañeda-Ovando, A., M. d. L. Pacheco-Hernández, et al. (2009). "Chemical studies of anthocyanins: A review." *Food Chem.* 113(4): 859-871.
- Cerqueira, N. M., N. F. Bras, et al. (2009). "MADAMM: a multistaged docking with an automated molecular modeling protocol". *Proteins* **74** (1): 192–206.
- Cerqueira, N., J. Ribeiro, et al. (2011). "VsLab-An implementation for virtual high-throughput screening using AutoDock and VMD." *Inter. J. Quantum Chem.*

- Chun, O. K., S. J. Chung, et al. (2007). "Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults." *J. Nutr.* 137(5): 1244-1252.
- Clifford, M. N. (2000). "Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden." *J. Sci. Food Agric.* 80(7): 1063-1072.
- Cotelle, N. (2001). "Role of flavonoids in oxidative stress." *Curr. Top Med. Chem.* 1(6): 569-590.
- Crespy, V., C. Morand, et al. (2001). "Quercetin, but not Its Glycosides, Is Absorbed from the Rat Stomach." *J. Agric. Food Chem.* 50(3): 618-621.
- Cvorovic J, Tramer, et al. (2010). "Oxidative stress-based cytotoxicity of delphinidin and cyanidin in colon cancer cells." *Arch Biochem Biophys* **501**:151–7.
- da Costa, C. T., Nelson, et al. (1998). "Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis." *J. Chrom. A*, 799(1–2), 321–327.
- Daayf, F. and V. Lattanzio (2008). *Recent advances in polyphenol research*. Chichester, West Sussex; Ames, Iowa, Wiley-Blackwell. 1: 1-379.
- Daglia M (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23(2), 153-159.
- Davies, A. J., and Mazza, G. (1993). "Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds." *J. Agr. and Food Chem.* 41(5), 716–720.
- Day, A. J., F. J. Canada, et al. (2000). "Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase." *FEBS Lett.* 468(2-3): 166-170.
- Day, A. J., M. S. DuPont, et al. (1998). "Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver b-glucosidase activity." *FEBS Lett.* 436(1): 71-75.
- DeFuria, J., G. Bennett, et al. (2009). "Dietary Blueberry Attenuates Whole-Body Insulin Resistance in High Fat-Fed Mice by Reducing Adipocyte Death and Its Inflammatory Sequelae." *J. Nutr.* 139(8): 1510– 1516.
- Delgado-Vargas, F., A. R. Jimenez, et al. (2000). "Natural pigments: carotenoids,

- anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability." *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40(3): 173- 289.
- Deng, D., C. Xu, et al. (2014). "Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1." *Nature*, 510, 121-125.
- Dey, P. M. and Harborne, J. B. (1993). "1. Plant phenolics methods in plant biochemistry (2nd printing). London: Academic Press Limited. pp. 326–341.
- Dragoni, S., Gee, J., et al. (2006). "Red wine alcohol promotes quercetin absorption and directs its metabolism towards isorhamnetin and tamarixetin in rat intestine in vitro." *Br. J. Pharmacol.* 147, 765–771.
- Eder R. 2000. Pigments. In *Food Analysis by HPLC*, ed. LML Nollet, pp. 845–80. Monticello, NY: Marcel
- Eiro, M. J., and Heinonen, M. (2002). "Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation." *J. Agr. and Food Chem.* 50(25), 7461–7466.
- Eraly, S. A., K. T. Bushet, al. (2004). "The molecular pharmacology of organic anion transporters: From dna to fda?" *Mol. Pharm.* 65, 479–487.
- Essmann, U., L. Perera, et al. (1995). "A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* 103, 8577–8593.
- Faria A., D. Pestana, et al. (2010). "Flavonoid transport across RBE4 cells: a blood-brain barrier." *Cell. Mol. Bio. Lett.*, 15(2): 234-241
- Faria, A., D. Pestana, et al. (2009). "Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells - Putative involvement of GLUT2." *Mol. Nutr. Food Res.* 53(11): 1430-1437.
- Faria, A., D. Pestana, et al. (2009). "Bioavailability of anthocyanin-pyruvic acid adducts in rat". *Inter. Conf. on Polyphenols and Health*, Yorkshire, Leeds.
- Felgines, C., O. Texier, et al. (2009). "Tissue distribution of anthocyanins in rats fed a blackberry anthocyanin-enriched diet." *Mol. Nutr. Food Res.* 53(9): 1098-1103.
- Felgines, C., O. Texier, et al. (2009). "Tissue distribution of anthocyanins in rats fed a blackberry anthocyanin-enriched diet." *Mol. Nutr. Food Res.*, 53, 1098–1103.

- Felgines, C., O. Texier, et al. (2008). "Influence of glucose on cyanidin 3- glucoside absorption in rats." *Mol. Nutr. Food Res.*, 52, 959–964.
- Felgines, C., S. Talavera, et al. (2006). "Absorption and metabolism of red orange juice anthocyanins in rats." *Br. J. Nutr.* 95(5): 898-904.
- Fernandes I, de Freitas V, Reis C, Mateus N. (2012). "New approach on the gastric absorption of anthocyanins." *Food Funct* 3:508–516.
- Fernandes, I., A. Faria, et al. (2014). "Bioavailability of anthocyanins and derivatives" *J. Func. Food* 7, 54-66
- Fernandes, I., F. Marques, et al. (2013). "Antioxidant and antiproliferative properties of methylated metabolites of anthocyanins." *Food Chem.* 141, 2923-2933.
- Fernandes, I., F. Nave, et al. (2009). "On the bioavailability of flavonols and anthocyanins: Flavanol-anthocaynin dimers." *Food Chem.* 135, 812-818
- Fleschhut, J., Kratzer, F., et al. (2006). "Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro." *Euro. J. Nutr.* 45(1), 7–18.
- Foster, R. (1969). "Organic charge-transfer complexes." London: Academic Press.
- Friesner, R. A., J. L. Banks, et al. (2004). "Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy". *J. Med. Chem.* 47 (7): 1739–49.
- Frisch, M. J., D. Trucks, et al. (2009). Gaussian 09. Wallingford, CT: Gaussian, Inc.
- Fukumoto, L. R. and G. Mazza (2000). "Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds." *J. Agric. Food Chem.* 48(8): 3597-3604.
- Galati, G., M. Y. Moridani, et al. (2001). "Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation." *Free Radic. Biol. Med.* 30(4): 370-382.
- Galli, R. L., B. Shukitt-Hale, et al. (2002). "Fruit polyphenolics and brain aging: nutritional interventions targeting age-related neuronal and behavioral deficits." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959: 128-132.
- García-Alonso M, Rimbach G, et al. (2004). "Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins A—studies in platelets, monocytes,

- and human endothelial cells." *J Agric Food Chem* **52**(11):3378–84.
- García-Benítez, E., Cabello, F., et al. (2003). "Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC–MS." *J Agr. and Food Chem.* 51(19): 5622–5629.
- Gee, J. M., M. S. DuPont, et al. (1998). "Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway." *Free Radic. Biol. Med.* 25(1): 19-25.
- Gee, J. M., M. S. DuPont, et al. (2000). "Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway." *J. Nutr.* 130(11): 2765-2771.
- Goldman, B.B., W. T. Wipke (2000). "QSD quadratic shape descriptors. 2. Molecular docking using quadratic shape descriptors (QSDock)". *Proteins* 38 (1): 79–94.
- Goldstein, J. L. and T. Swain (1963). "Changes in tannins in ripening fruits." *Phytochemistry* 2(4): 371-383.
- González-Paramás, A. M., F. Lopes da Silva, et al. (2006). "Flavanol–anthocyanin condensed pigments in plant extracts." *Food Chem.* 94(3): 428-436.
- Habauzit, V. and C. Morand (2012). "Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians." *Ther. Adv. Chron. Dis.* 3(2), 87-106.
- Hale, K. L., McGrath, S. P., et al. (2001). "Molybdenum sequestration in Brassica species. A role for anthocyanins?" *Plant Physio.* 126, 1391–1402.
- Hanasaki, Y., S. Ogawa, et al. (1994). "The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids." *Free Radic. Biol. Med.* 16(6): 845-850.
- Harborne, J. B. and C. A. Williams (2000). "Advances in flavonoid research since 1992." *Phytochemistry* 55(6): 481-504.
- Hartmann, C., I. Antes , et al. (2009). "Docking and scoring with alternative side-chain conformations". *Proteins* 74 (3): 712–26.
- He J, Giusti MM. 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annu Rev Food Sci Technol* **1**:163–87.
- He, J., T. C. Wallace et al. (2009). "Stability of black raspberry anthocyanins in the

- digestive tract lumen and transport efficiency into gastric and small intestinal tissues in the rat." *J. Agr. Food Chem.*, 57, 3141–3148.
- Heim, K. E., A. R. Tagliaferro, et al. (2002). "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure- activity relationships." *J. Nutr. Biochem.* 13(10): 572-584.
- Heinonen, M. (2007). "Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics - a Finnish perspective." *Mol. Nutr. Food Res.* 51(6): 684-691.
- Heredia, F. J., Francia-Aricha, et al. (1998). "Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – I. pH effect." *Food Chem.* 63(4), 491–498.
- Hertog, M. G., P. C. Hollman, et al. (1993). "Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands." *Nutr. Cancer* 20(1): 21-29.
- Hogben, C. A. M., L. S. Schanker, et al. (1957). "Absorption of drugs from the stomach. II. The human." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 120(4): 540-545.
- Hollman, P. C. H. (2004). "Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids." *Pharm. Biol.* 42(1 supp 1): 74 - 83.
- Hollman, P. C., M. N. Bijlsman, et al. (1999). "The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man." *Free Radic. Res.* 31(6): 569-573.
- Hou, D. X., T. Ose, et al. (2003). "Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved." *Int. J. Oncol.* 23(3): 705-712.
- Huang, D., B. Ou, et al. (2005). "The chemistry behind antioxidant capacity assays." *J. Agric. Food Chem.* 53(6): 1841-1856.
- Ichihara, T., M. M. Rahman, et al. (2004). "Absorption and metabolism of delphinidin 3-O-b-D-glucoside in rats." *Biofactors* 21(1-4): 411-413.
- Ichihara, T., M. M. Rahman, et al. (2004). "Absorption and metabolism of delphinidin 3-O-b- glucopyranoside in rats." *Free Radic. Biol. Med.* 36(7): 930-937.
- Ichihara, T., Y. Shida, et al. (2005). "Extended glucuronidation is another major path of cyanidin 3-O-b- D-glucopyranoside metabolism in rats." *J. Agric. Food Chem.*

53(18): 7312-7319.

Ichianagi, T., Y. Shida, et al. (2005). "Metabolic pathway of cyanidin 3-O-b-D-glucopyranoside in rats." *J. Agric. Food Chem.* 53(1): 145-150.

Ichianagi, T., Y. Shida, et al. (2006). "Bioavailability and tissue distribution of anthocyanins in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract in rats." *J. Agric. Food Chem.* 54(18): 6578-6587.

Izaguirre, J. A., D. P. Catarello, et al. (2001). "Langevin stabilization of molecular dynamics." *J. Chem. Phys.* 114, 2090–2098.

Kähkönen, M. P. and M. Heinonen (2003). "Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons." *J. Agric. Food Chem.* 51(3): 628-633.

Kalt, W., J. B. Blumberg, et al. (2008). "Identification of Anthocyanins in the Liver, Eye, and Brain of Blueberry-Fed Pigs." *J. Agric. Food Chem.* 56(3): 705-712.

Kamei, H., T. Kojima, et al. (1995). "Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro." *Cancer Invest.* 13(6): 590-594.

Karakaya, S. (2004). "Bioavailability of phenolic compounds." *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44(6): 453-464.

Karlsen, A., L. Retterstøl, et al. (2007). "Anthocyanins Inhibit Nuclear Factor-kappaB Activation in Monocytes and Reduce Plasma Concentrations of Pro-Inflammatory Mediators in Healthy Adults." *J. Nutr.* 137(8): 1951-1954.

Katsube, N., K. Iwashita, et al. (2003). "Induction of apoptosis in cancer cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins." *J. Agric. Food Chem.* 51(1): 68-75.

Kaur, C. and H. C. Kapoor (2001). "Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health." *Int. J. Mol. Sci.* 36(7): 703-725.

Kavvada, K. M., J. G. Murray, et al. (2006). "High permeability of the anionic form restricts accumulation of indomethacin by cultured gastric surface epithelial cells exposed to low apical pH." *Eur. J. Pharmacol.* 549(1-3): 41-49.

Kay, C. D. (2006). "Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans." *Nutr. Res. Rev.* 19(1): 137-146.

- Kearsley, S. K., D. J. Underwood, et al. (1994). "Flexibases: a way to enhance the use of molecular docking methods". *J. Comput. Aided Mol. Des.* 8 (5): 565–82.
- Kennedy, J. A., and Waterhouse, A. L. (2000). "Analysis of pigmented high-molecular-mass grape phenolics using ion-pair, normal-phase high-performance liquid chromatography." *J. Chrom. A*, 866(1), 25–34.
- Kitchen, D. B., H. Decornez, et al. (2004). "Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications". *Nature reviews. Drug discovery* 3 (11): 935–49.
- Konczak, I., W. Zang (2004). "Anthocyanins-More than nature's colours." *J. Biomed. Biotech.*, 5, 279-286.
- Kong, J. M., L. S. Chia, et al. (2003). "Analysis and biological activities of anthocyanins." *Phytochemistry* 64(5): 923-933
- Kuhnau, J. (1976). "The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition." *World Rev. Nutr. Diet* 24: 117-191.
- Lala, G., M. Malik, et al. (2006). "Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats." *Nutr. Cancer* 54(1): 84-93.
- Lazze, M. C., M. Savio, et al. (2004). "Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines." *Carcinogenesis* 25(8): 1427-1433.
- Lee, K. W. and H. J. Lee (2006). "The roles of polyphenols in cancer chemoprevention." *Biofactors* 26(2): 105-121.
- Lemos, C., G. J. Peters, et al. (2007). "Modulation of folate uptake in cultured human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by dietary compounds." *Eur. J. Nutr.* 46, 329–336.
- Lengauer, T., M. Rarey (1996). "Computational methods for biomolecular docking". *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6 (3): 402–6.
- Liska, D., M. Lyon, et al. (2006). "Detoxification and Biotransformational Imbalances." *EXPLORE-NY*. 2(2): 122-140.
- Liu, R. H. (2004). "Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action." *J. Nutr.* 134(12 Suppl): 3479S-3485S.

- M. Daglia (2012). "Polyphenols as antimicrobial agents." *Curr. Opin. In Biotech.* 23, 174-181.
- Mallery, S. R., D. E. Budendorf, et al. (2011). "Effects of human oral mucosal tissue, saliva and oral microflora on intraoral metabolism and bioactivation of black raspberry anthocyanins." *Cancer Prev. Res.*
- Matsufuji, H., Otsuki, T., et al. (2003). "Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals." *J. Agr. and Food Chem.* 51(10), 3157–3161.
- Matsui, T., T. Ueda, et al. (2001). " α -Glucosidase Inhibitory Action of Natural Acylated Anthocyanins. 1. Survey of Natural Pigments with Potent Inhibitory Activity." *J. Agric. Food Chem.* 49(4): 1948-1951.
- Matsumoto, H., H. Inaba, et al. (2001). "Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3- rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms." *J. Agric. Food Chem.* 49(3): 1546-1551.
- Matsumoto, H., Y. Nakamura, et al. (2003). "Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin." *J. Agric. Food Chem.* 51(12): 3560-3563.
- Mazza, G. and R. Brouillard (1990). "The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions." *Phytochemistry* 29(4): 1097-1102.
- Mazza, G., C. D. Kay, et al. (2002). "Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects." *J. Agric. Food Chem.* 50(26): 7731-7737.
- McGhie, T. K. and M. C. Walton (2007). "The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding." *Mol. Nutr. Food Res.* 51(6): 702-713.
- McGhie, T. K., G. D. Ainge, et al. (2003). "Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats." *J. Agric. Food Chem.* 51(16): 4539-4548.
- Meiers, S., M. Kemeny, et al. (2001). "The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor." *J. Agric. Food Chem.* 49(2): 958-962.

- Meng, E.C., B. K. Shoichet, et al. (2004). "Automated docking with grid-based energy evaluation". *J. Comp. Chem.* 13 (4): 505–524.
- Middleton, E., Jr., C. Kandaswami, et al. (2000). "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer." *Pharmacol. Rev.* 52(4): 673-751.
- Milbury, P. E., G. Cao, et al. (2002). "Bioavailability of elderberry anthocyanins." *Mech. Ageing Dev.* 123(8): 997-1006.
- Miyazawa, T., K. Nakagawa, et al. (1999). "Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin- 3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans." *J. Agric. Food Chem.* 47(3): 1083-1091.
- MOHSEN, M.S., S.M.A. AMMAR, et al. (2008). "Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts." *Food Chem.* 112, 595-598.
- Moncada, M. C., Moura, S., et al. (2003). "Complexation of aluminum(III) by anthocyanins and synthetic flavylum salts: A source for blue and purple color." *Inorg. Chimica Acta*, 356, 51–61.
- Morazzoni, P. and E. Bombardelli (1996). "*Vaccinium myrtillus* L." *Fitoterapia* 67(1): 3-29.
- Mulleder, U., M. Murkovic, et al. (2002). "Urinary excretion of cyanidin glycosides." *J. Biochem. Biophys. Methods* 53(1-3): 61-66.
- Narayan, M. S., K. A. Naidu, et al. (1999). "Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non- enzymatic lipid peroxidation." *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 60(1): 1-4.
- Nichenametia, S. N., T. G. Taruscio, et al. (2006). "A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer." *Crit. Rev Food Sci. Nutr.*, 46(2): 161-83.
- Nicolin, V., V. Grill, et al. (2005). "Immunolocalisation of bilitranslocase in mucosecretory and parietal cells of the rat gastric mucosa." *J. Mol. Hist.* 36, 45–50.
- Noda, Y., T. Kaneyuki, et al. (1998). "Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant." *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 102(2): 175-187.
- Noguchi, Y., S. Sato, et al. (1998). "Glucose uptake in the human gastric cancer line,

- MKN-28, is increased by insulin stimulation." *Cancer Lett.* 140(1-2): 69-74.
- Passamonti, S., U. Vrhovsek, et al. (2002). "The interaction of anthocyanins with bilitranslocase." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296(3): 631-636.
- Passamonti, S., U. Vrhovsek, et al. (2003). "The stomach as a site for anthocyanins absorption from food." *FEBS Lett.* 544(1-3): 210-213.
- Passamonti, S., U. Vrhovsek, et al. (2005). "Fast Access of Some Grape Pigments to the Brain." *J. Agric. Food Chem.* 53(18): 7029-7034.
- Piskula, M. K., J. Yamakoshi, et al. (1999). "Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach." *FEBS Lett.* 447(2): 287-291.
- Prior, R. L. and X. Wu (2006). "Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities." *Free Radic. Res.* 40(10): 1014-1028.
- Quideau, S., D. Deffieux, et al. (2011). "Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities and synthesis." *Ang. Chimie Inter. Ed.* 50, 586-621.
- Rahman MM, Ichihyanagi T, et al. (2006). "Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism." *Free Radical Res* **40**(9):993–1002.
- Ramirez-Tortosa, C., O. M. Andersen, et al. (2001). "Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats." *Free Radic. Biol. Med.* 31(9): 1033-1037.
- Rayalam, S., M. A. Della-Fera, et al. (2008). "Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle." *J. Nutr. Biochem.* 19(11): 717-726.
- Rein, M. (2005). "Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins." Helsinki: University of Helsinki. pp. 10–14.
- Ren, W., Z. Qiao, et al. (2003). "Flavonoids: promising anticancer agents." *Med. Res. Rev.* 23(4): 519-534.
- Renaud, S. and M. de Lorgeril (1992). "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease." *Lancet* 339(8808): 1523-1526.

- Rice-Evans, C. (2001). "Flavonoid antioxidants." *Curr. Med. Chem.* 8(7): 797-807.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, et al. (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." *Free Radic. Biol. Med.* 20(7): 933-956.
- Rossetto M, Vanzani P, et al. (2002). "Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin 3-glucoside on free radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles." *Arch Biochem Biophys* **408**:239–45.
- Rossetto M, Vanzani P, et al. (2007). "Peroxyl radical trapping activity of anthocyanins and generation of free radical intermediates." *Free Radical Res* **41**(7):854–9.
- Ryckaert, J. P., R. Ciccotti, et al. (1977). "Numerical-integration of Cartesian equations of motion of a system with constraints – molecular-dynamics of N-alkanes." *J. Comp. Phys.* 23, 327–341.
- Santos, N. C., J. Figueira-Coelho, et al. (2003). "Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular and molecular aspects." *Biochem. Pharm.* 65, 1035-1041.
- Satué-Gracia, M. T., M. Heinonen, et al. (1997). "Anthocyanins as Antioxidants on Human Low-Density Lipoprotein and Lecithin-Liposome Systems." *J. Agric. Food Chem.* 45(9): 3362-3367.
- Scalbert, A. and G. Williamson (2000). "Dietary intake and bioavailability of polyphenols." *J. Nutr.* 130(8S Suppl): 2073S-2085S.
- Scholz, S. and G. Williamson (2007). "Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols in vivo." *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 77(3): 224-235.
- Seeram, N. P., L. D. Bourquin, et al. (2001). "Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities." *J. Agric. Food Chem.* 49(10): 4924-4929.
- Shahidi F, Naczk M. 2004. Contribution of phenolic compounds to flavor and color characteristics of foods. In *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, eds. F Shahidi, M Naczk, pp. 443–61. Boca Raton, FL: CRC Press
- Spencer, J. P. (2009). "The impact of flavonoids on memory: physiological and molecular considerations." *Chem. Soc. Rev.* 38(4): 1152-1161.

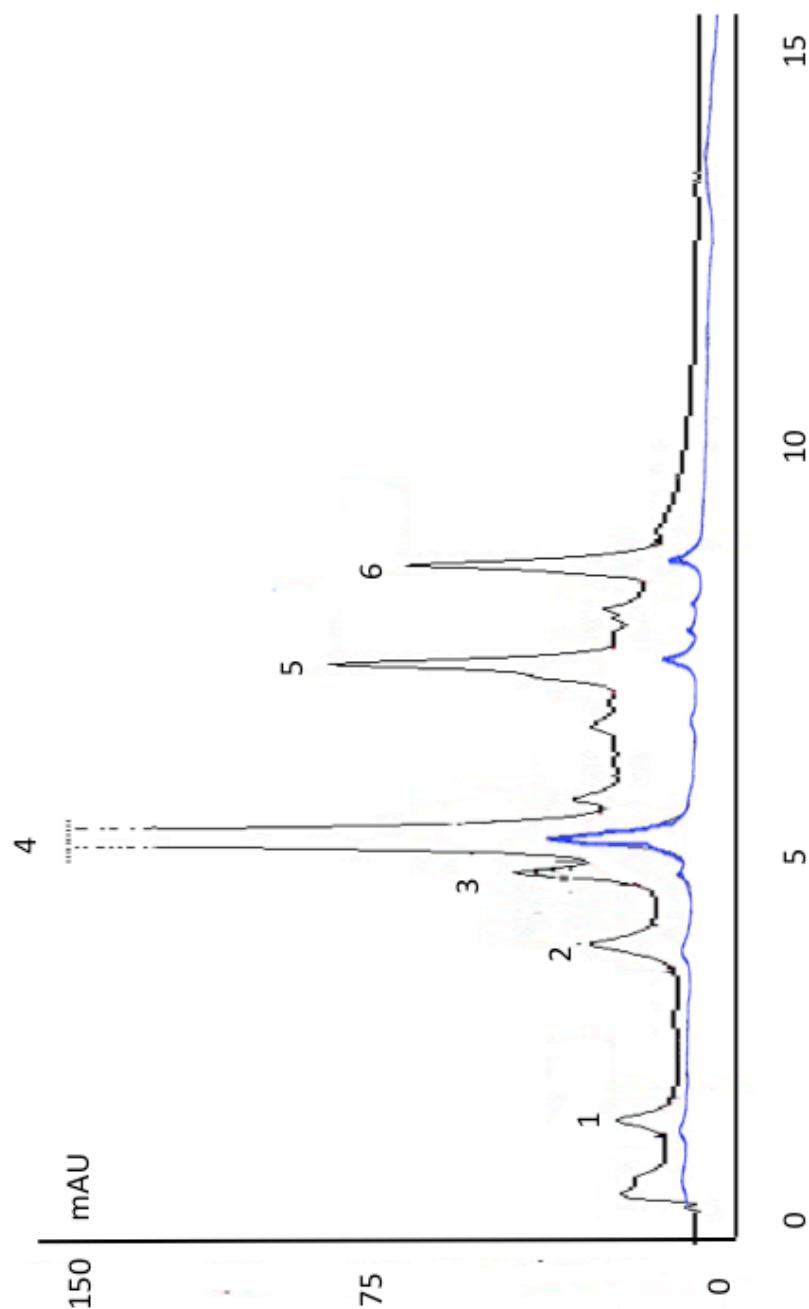
- Starr, M. S., and Francis, F. J. (1973). "Effect of metallic ions on color and pigment content of cranberry juice cocktail." *J. Food Sci.* 38(6), 1043–1046.
- Steffen Y, Gruber C, Schewe T, Sies H. 2008. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* **469**:209–19.
- Stintzing, F. C. and R. Carle (2004). "Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition." *Trends Food Sci. Technol.* 15(1): 19-38.
- Sun, L., X. Zeng, et al. (2012). "Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4." *Nature*, 490, 361-366.
- Szmitko, P. E. and S. Verma (2005). "Antiatherogenic potential of red wine: clinician update." *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288(5): H2023-H2030.
- Takeoka G, Dao L. 2002. Anthocyanins. In *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, ed. W Hurst, pp. 219–41. Boca Raton, FL: CRC
- Talavera, S., C. Felgines, et al. (2003). "Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats." *J. Nutr.* 133(12): 4178-4182.
- Talavera, S., C. Felgines, et al. (2004). "Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats." *J. Nutr.* 134(9): 2275-2279.
- Totrov, M., R. Abagyan (2008). "Flexible ligand docking to multiple receptor conformations: a practical alternative". *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18 (2): 178–84.
- Tsuda, T., F. Horio, et al. (1999). "Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-b-D-glucoside in rats." *FEBS Lett.* 449(2-3): 179-182.
- Ueda, S., H. Nakamura, et al. (2002). "Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant." *Mol. Immunol.* 38(10): 781-791.
- Vanzo, A., M. Terdoslavich, et al. (2008). "Uptake of grape anthocyanins into the rat kidney and the involvement of bilitranslocase." *Mol. Nutr. Food Res.* 52(10): 1106-1116.
- Vitaglione P, Donnarumma G. 2007. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J Nutr* **137**:2043–8.

- Walgren, R. A., J. T. Lin, et al. (2000). "Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294(3): 837-843.
- Walle, T. (2004). "Absorption and metabolism of flavonoids." *Free Radic. Biol. Med.* 36(7): 829-837.
- Walle, T., A. M. Browning, et al. (2005). "Flavonoid Glucosides Are Hydrolyzed and Thus Activated in the Oral Cavity in Humans." *J. Nutr.* 135(1): 48-52.
- Walton, M. C., T. K. McGhie, et al. (2006). "The flavonol quercetin-3-glucoside inhibits cyanidin-3- glucoside absorption in vitro." *J. Agric. Food Chem.* 54(13): 4913-4920.
- Walton, M. C., T. K. McGhie, et al. (2006). "The flavonol quercetin-3-glucoside inhibits cyanidin-3- glucoside absorption in vitro." *J. Agric. Food Chem.* 54(13): 4913-4920.
- Wang, H., G. Cao, et al. (1997). "Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins." *J. Agric. Food Chem.* 45(2): 304-309.
- Wang, H., G. Cao, et al. (1997). "Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins." *J. Agric. Food Chem.* 45(2): 304-309.
- Wang, H., M. G. Nair, et al. (1999). "Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries." *J. Nat. Prod.* 62(2): 294-296.
- Wang, I. K., S. Y. Lin-Shiau, et al. (1999). "Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells." *Eur. J. Cancer* 35(10): 1517-1525.
- Wang, J. and G. Mazza (2002). "Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages." *J. Agric. Food Chem.* 50(4): 850-857.
- Wang, L. S. and G. D. Stoner (2008). "Anthocyanins and their role in cancer prevention." *Cancer Lett.* 269(2): 281-290.
- Wang, Q., Y. P. Pang (2007). "Preference of small molecules for local minimum conformations when binding to proteins". *PLoS ONE* 2 (9): e820.
- Weisel T, Baum M, Eisenbrand G, 2006. An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice

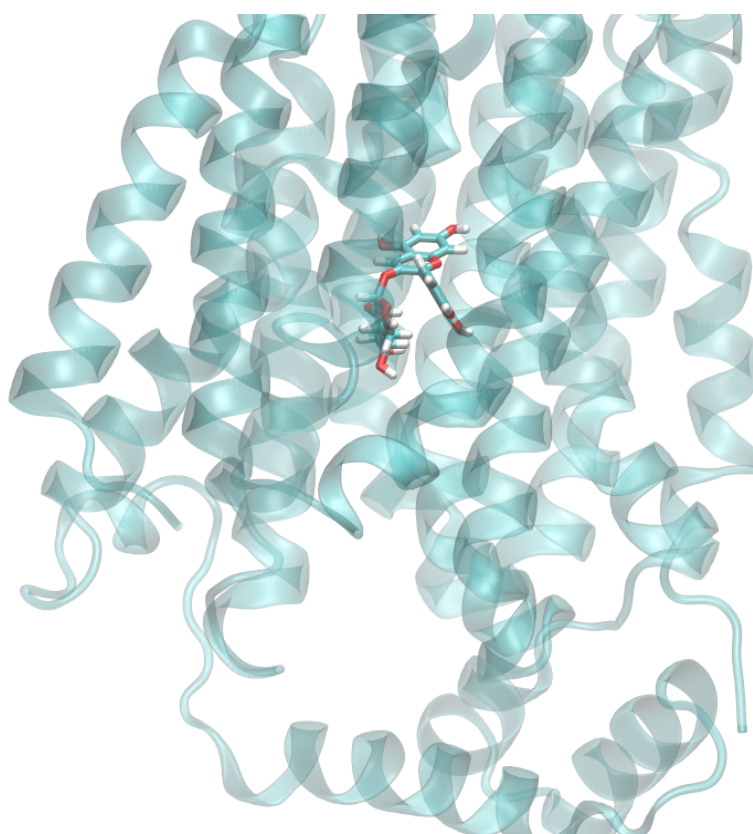
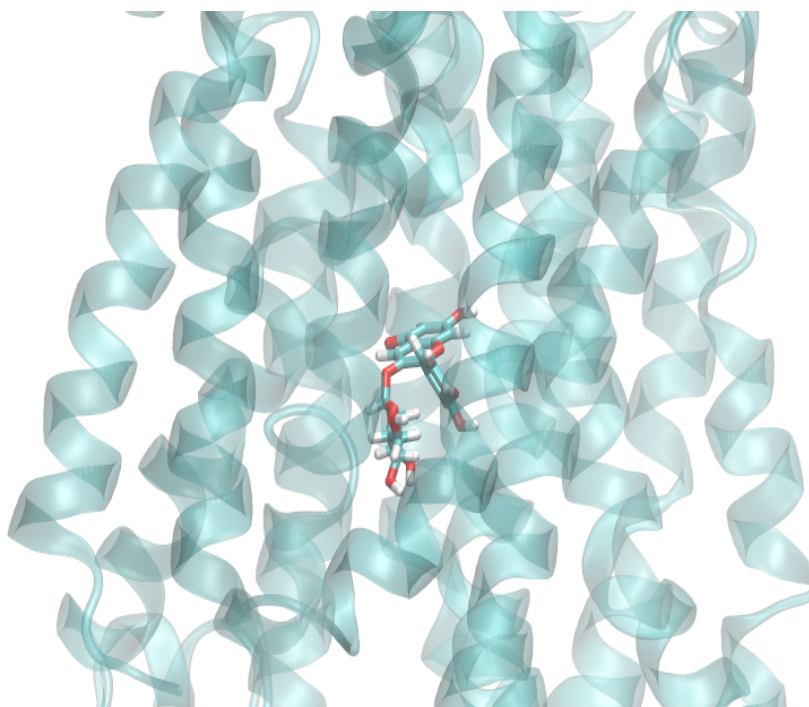
- reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy proband. *Biotechnol J* 1(4):388–97.
- Wiese, S., S. Gärtner, et al. (2009). "Protein interactions with cyanidin-3-glucoside and its influence on α - amylase activity." *J. Sci. Food Agric.* 89(1): 33-40.
- Williamson, G. and M. N. Clifford (2010). "Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity?" *Br. J. Nutr.* 104: pp S48-S66.
- Woodward, G. M., P. W. Needs, et al. (2011). "Anthocyanin-derived phenolic acids form glucuronides following simulated gastrointestinal digestion and microsomal glucuronidation." *Mol. Nutr. Food Res.* 55(3): 378-386.
- Woodward, G., P. Kroon, et al. (2009). "Anthocyanin Stability and Recovery: Implications for the Analysis of Clinical and Experimental Samples." *J. Agric. Food Chem.* 57(12): 5271-5278.
- Wu, X., G. Cao, et al. (2002). "Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry." *J. Nutr.* 132(7): 1865-1871.
- Wu, X., G. R. Beecher, et al. (2006). "Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption." *J. Agric. Food Chem.* 54(11): 4069-4075.
- Xu, J. W., K. Ikeda, et al. (2004). "Cyanidin-3-glucoside regulates phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase." *FEBS Lett.* 574(1-3): 176-180.
- Yang M, Koo SI, Song WO, Chun OK. (2011). Food matrix affecting anthocyanin bioavailability: review. *Curr Med Chem* 18(2):291–300.
- Yi, W., C. C. Akoh, et al. (2006). "Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by caco-2 human intestinal cell monolayers." *J. Agric. Food Chem.* 54(15): 5651-5658.
- Yoshida, K., S. Kitahara et al. (2006). "Ferric ions involved in the flower color development of the Himalayan blue poppy, *Meconopsis grandis*." *Phyto.* 67(10), 992–998.
- Yoshikawa, T., R. Inoue, et al. (2011). "Comparative expression of hexose transporters (SGLT1, GLUT1, GLUT2 and GLUT5) throughout the mouse gastrointestinal tract." *Hist. Cell Bio.* 135, 183–194.

- Youdim, K. A., J. McDonald, et al. (2002). "Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled)." *J. Nutr. Biochem.* 13(5): 282-288.
- Zhang Y, Seeram NP, Lee R, Feng L, Heber D. 2008. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *J Agric Food Chem* **56**(3):670–5.
- Zhang Y, Vareed SK, Nair MG. 2005. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sci* **76**(13):1465–72.
- Zhao C, Giusti MM, Malik M, Moyer MP, Magnuson BA. 2004. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *J Agric Food Chem* **52**:6122–8.
- Ziberna L, Lunder M, Moze S, Vanzo A, Tramer F, Passamonti S, Drevensek G. 2010. Acute cardioprotective and cardiotoxic effects of bilberry anthocyanins in ischemia-reperfusion injury: beyond concentration-dependent antioxidant activity. *Cardiovasc Toxicol* **10**(4):283–94.
- Ziberna L, Tramer F, Moze S, Vrhovsek U, Mattivi F, Passamonti S. 2012. Transport and bioactivity of cyanidin 3-glucoside into the vascular endothelium. *Free Radic Biol Med* **52**(9):1750–9.
- Zsoldos, Z., D. Reid, et al. (2007). "eHiTS: A new fast, exhaustive flexible ligand docking system". *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 26 (1): 198–212.

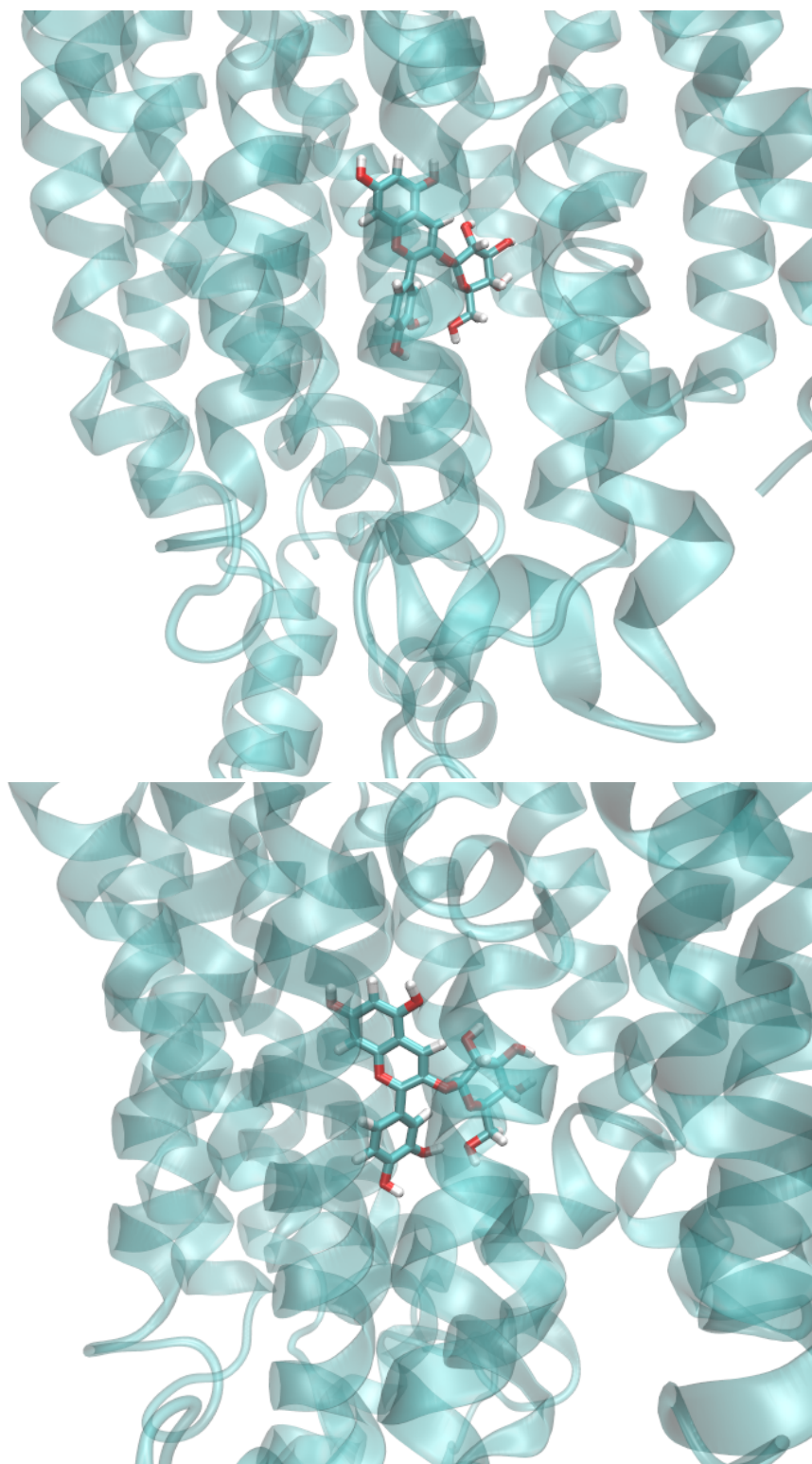
ANEXOS



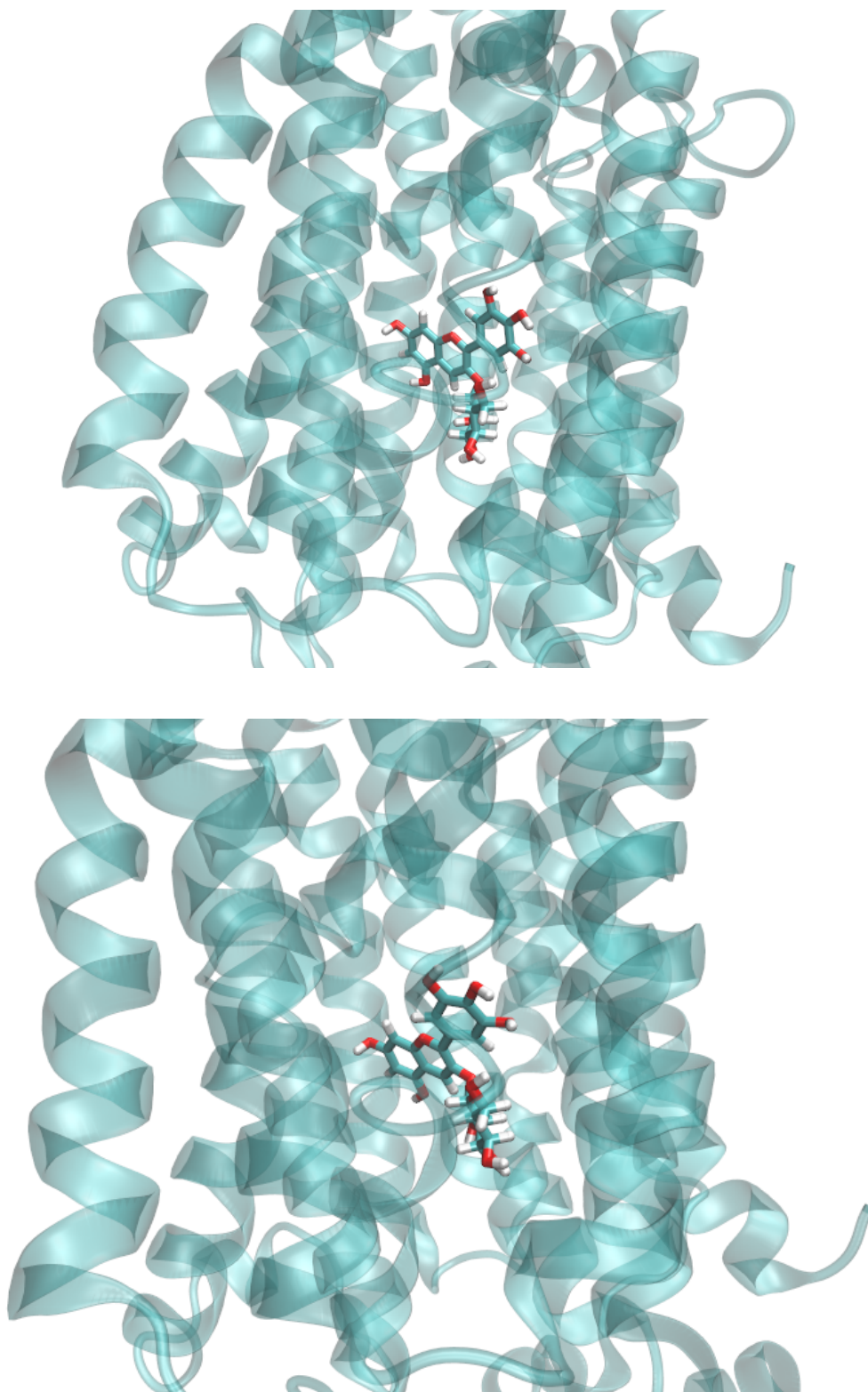
Anexo A. Cromatograma representativo da fração apical (normal) e da fração basolateral ao fim de 180 minutos (negrito). 1 - delphinidina-3-glucose; 2 – petunidina-3-glucose; 3 – peonidina-3-glucose; 4 – malvidina-3-glucose; 5 – malvidina-3-acetilglucose; 6 – malvidina-3-cumaroilglucose. gradiente de eluição: 0 – 7 min: 94,5% A – 64% A; 7 – 10 min: 64% A – 20% A; 10 – 10,1 min: 20%A – 0%A; 10,1 – 12 min: 100% B isocrático; 12 – 15 min: 94,5% A , 5,5% B isocrático. Fluxo 0,5 mL/ min. Volume de injeção 10 µL. Detecção a 520 nm. Solventes: solvente A – 5% HCOOH; solvente B – 100% ACN.



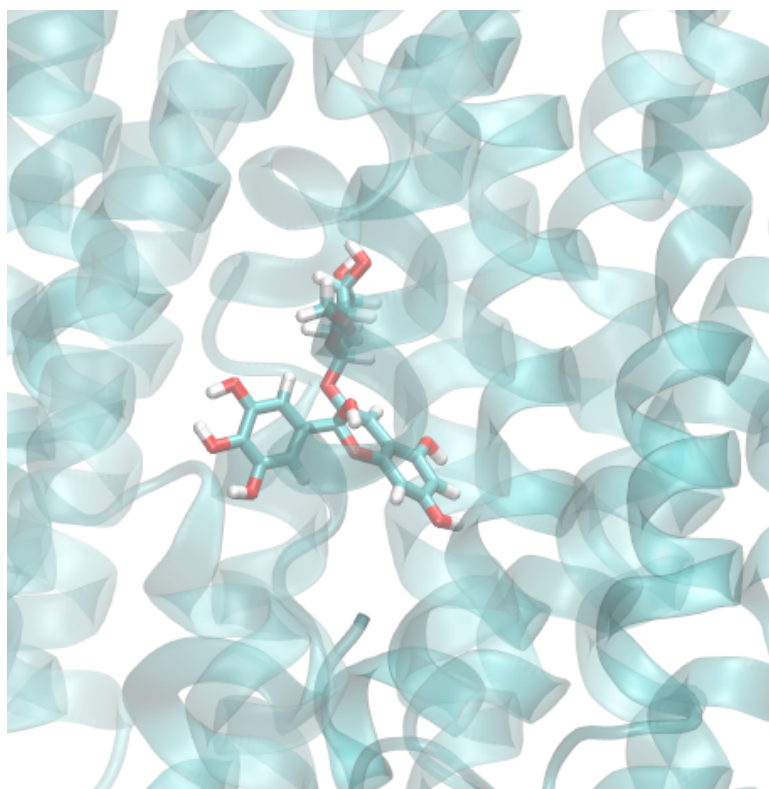
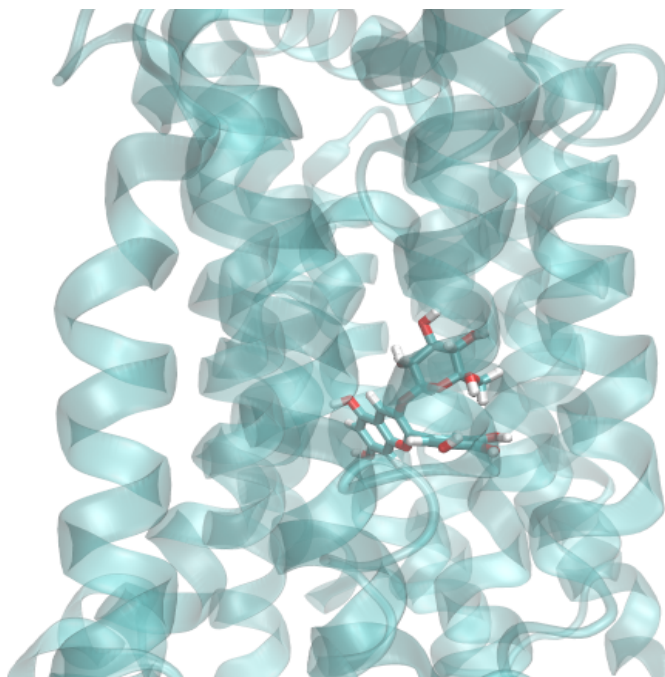
Anexo I. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da cianidina-3-glucose (S1) na sua forma de cetião flavílio ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.



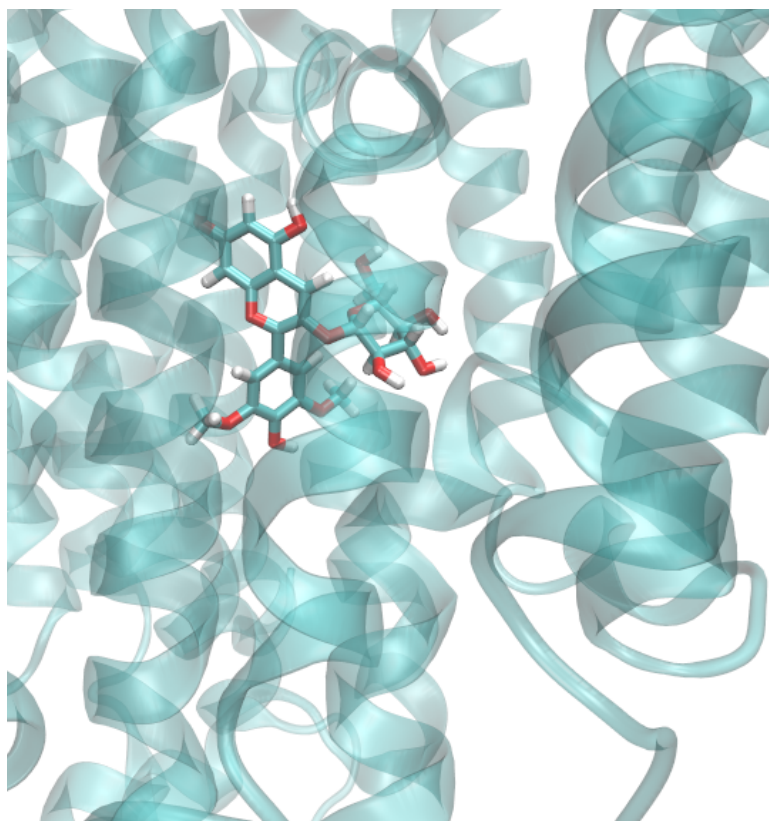
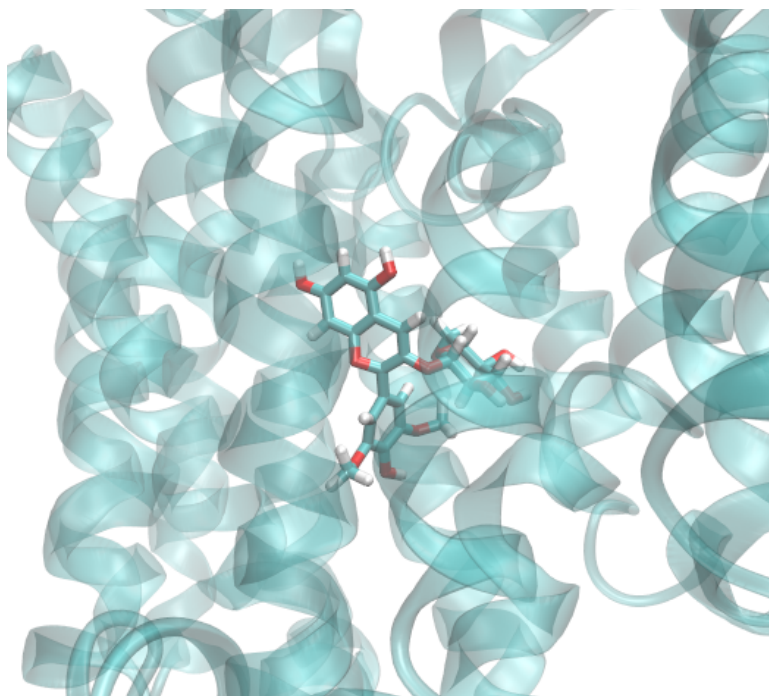
Anexo II. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da cianidina-3-glucose (S2) na sua forma de cetião flavílio ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.



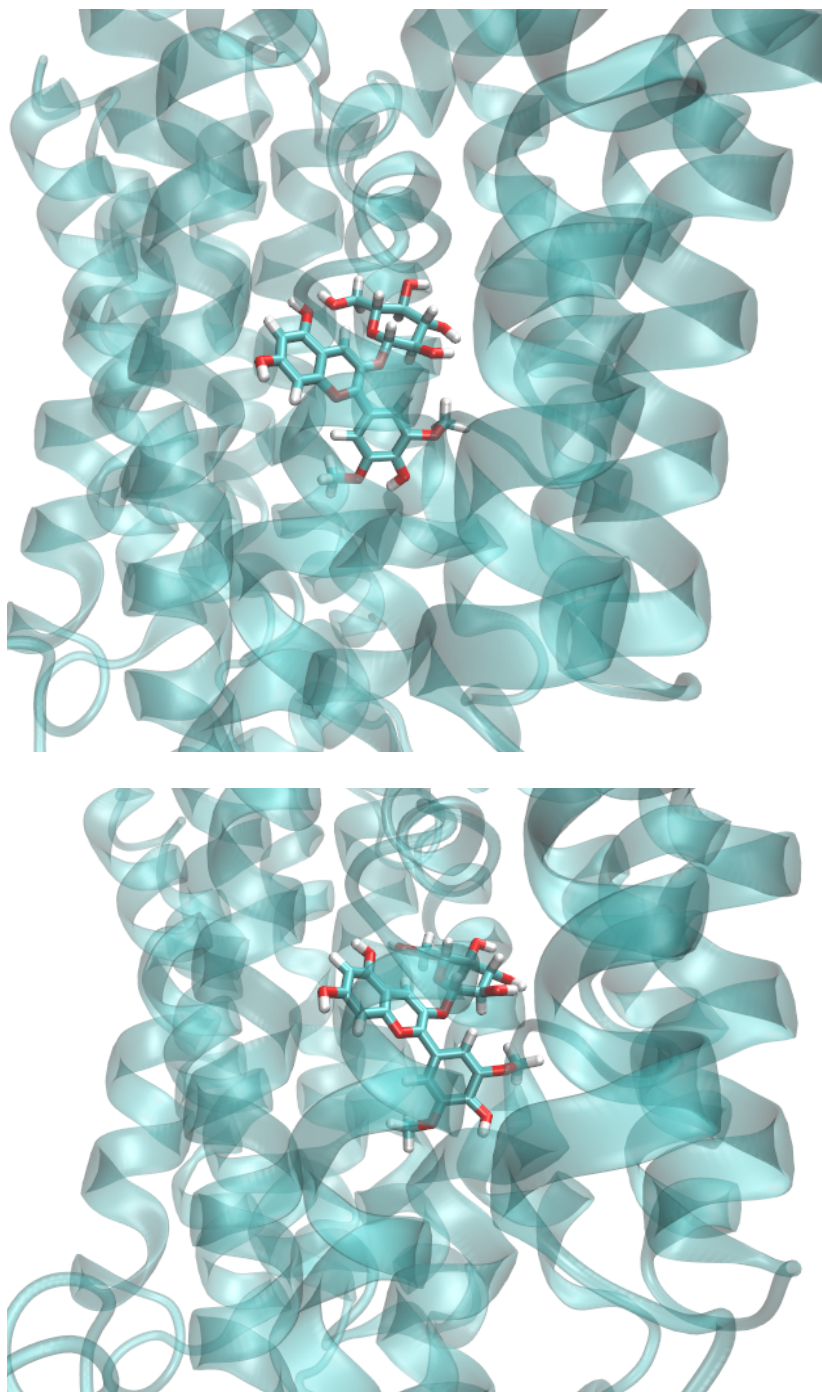
Anexo III. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da delphinidina-3-glucose (S1) na sua forma de cetião flavílio ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.



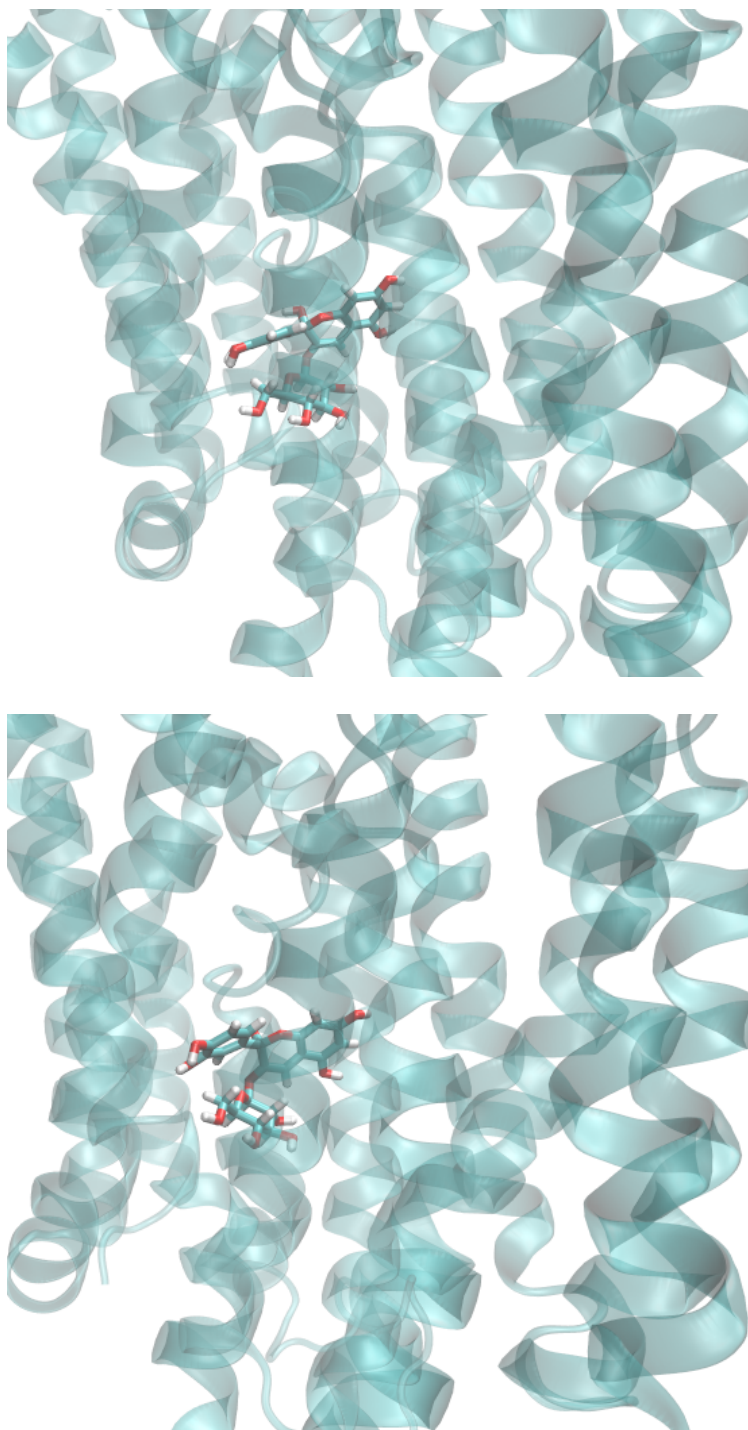
Anexo IV. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da delphinidina-3-glucose (S2) na sua forma de cetião flavílio ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.



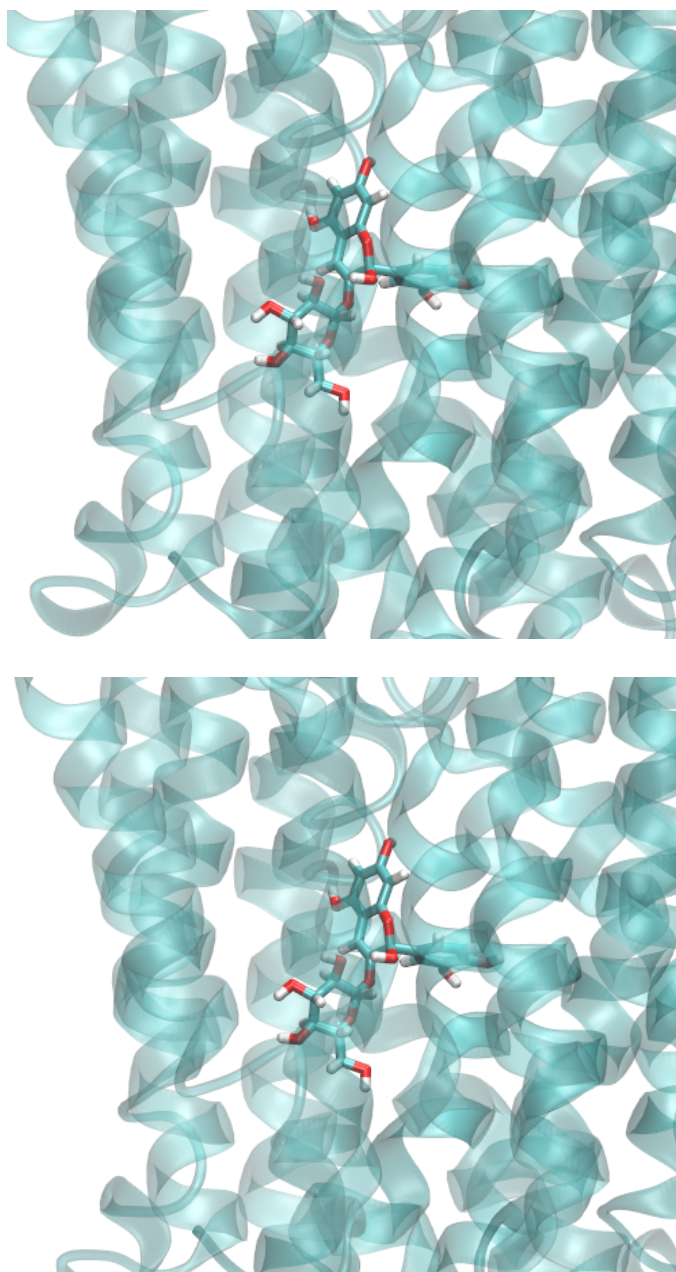
Anexo V. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da malvidina-3-glucose (S1) na sua forma de catião flavílio ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.



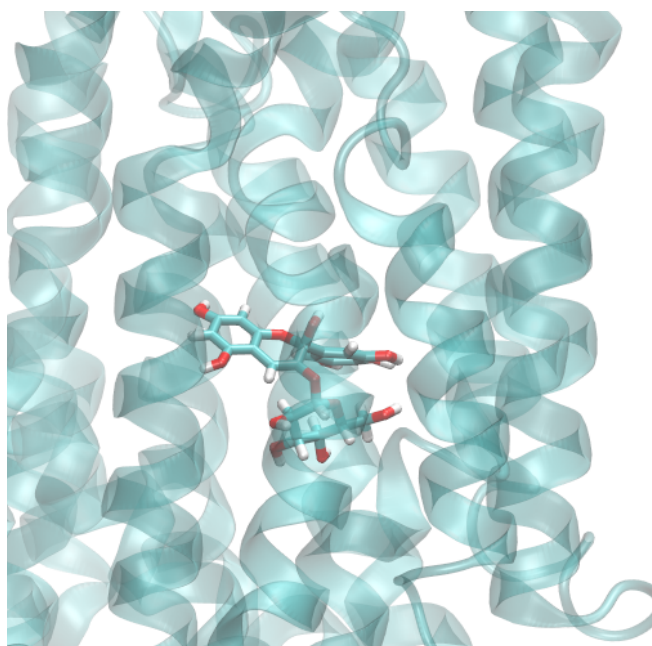
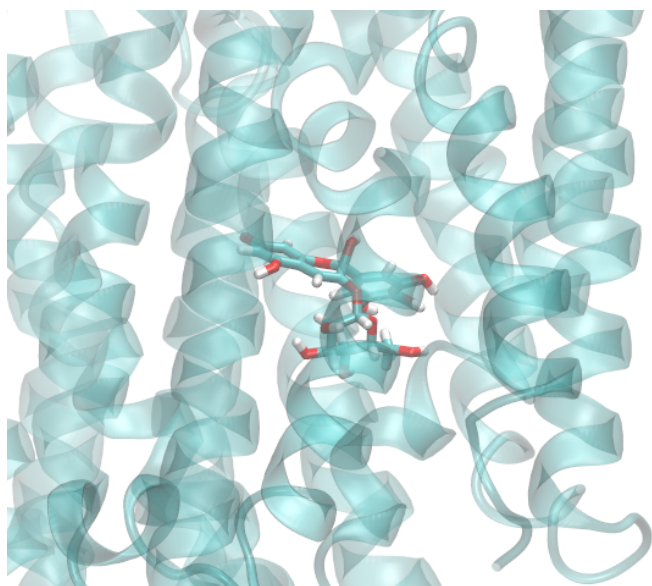
Anexo VI. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da malvidina-3-glucose (S2) na sua forma de catião flavílio ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.



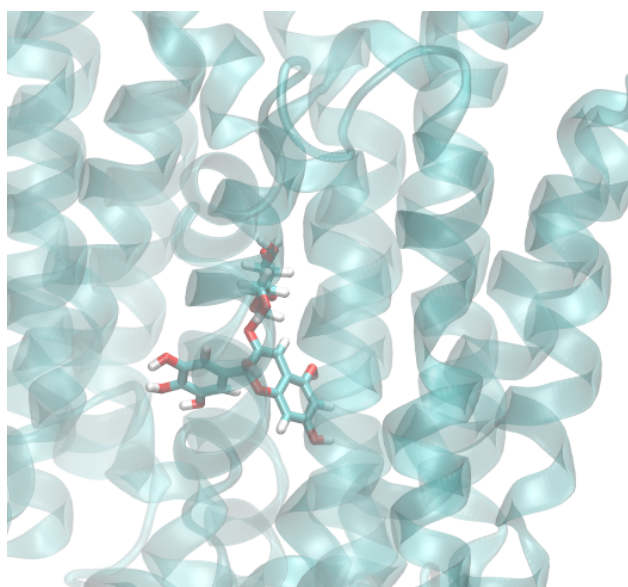
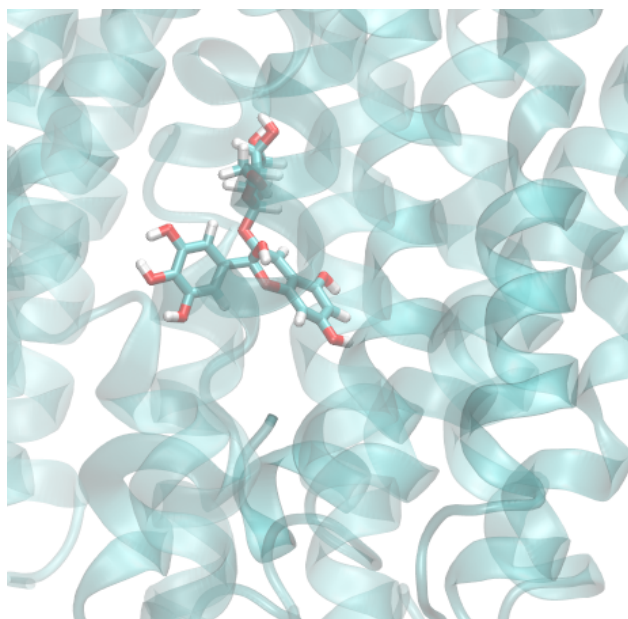
Anexo VII. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da cianidina-3-glucose (S1) na sua forma de hemiacetal ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.



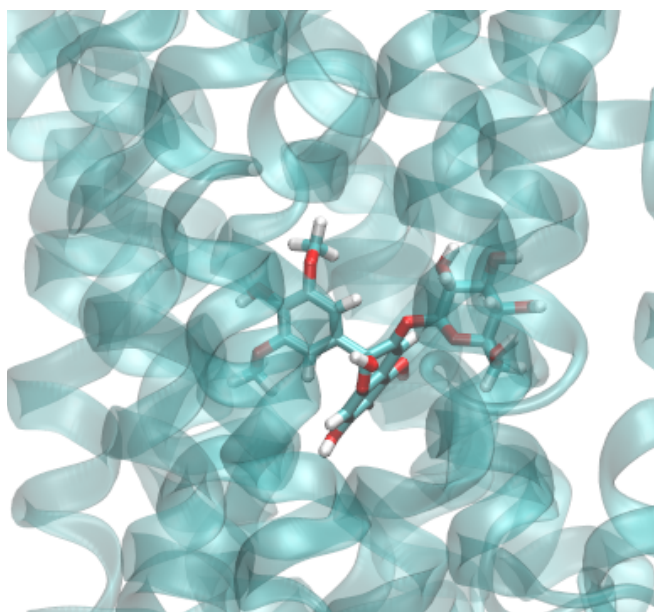
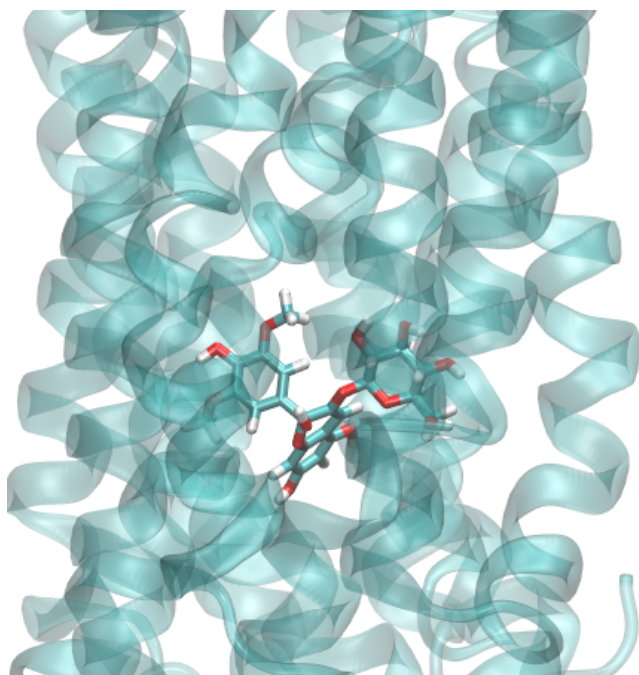
Anexo VIII. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da cianidina-3-glucose (S2) na sua forma de hemiacetal ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.



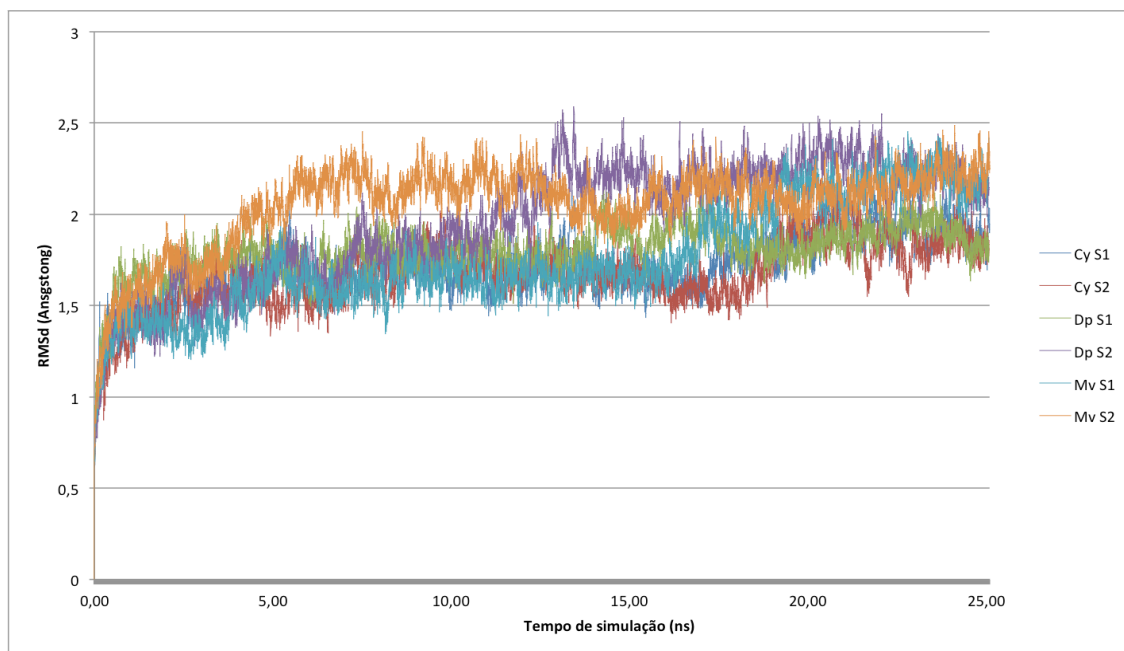
Anexo IX. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da delphinidina-3-glucose (S1) na sua forma de hemiacetal ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.



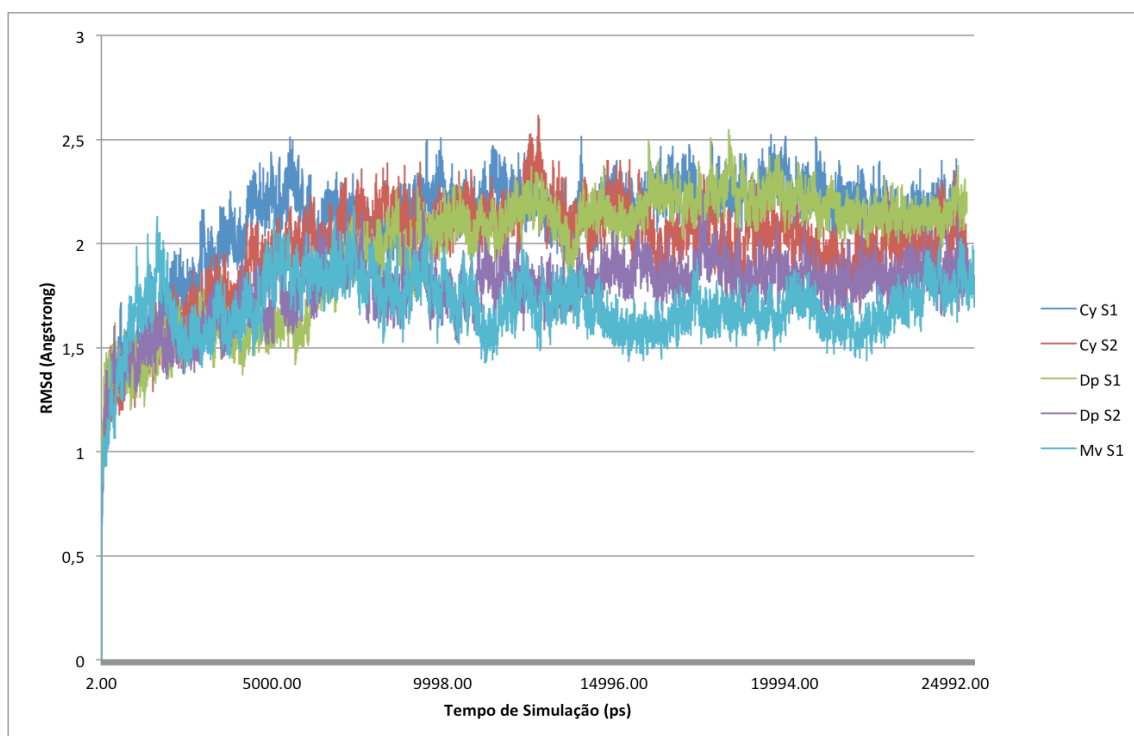
Anexo X. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da delphinidina-3-glucose (S2) na sua forma de hemiacetal ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.



Anexo XI. Representação da posição inicial (em cima) e média (em baixo) da malvidina-3-glucose (S1) na sua forma de hemiacetal ao longo da dinâmica molecular de 25 ns.



Anexo XII. Valores de RMSd para os cátions das antocianinas durante a simulação de dinâmica molecular. CyS1 – solução 1 da cianidina-3-glucose; CyS2 – solução 2 da cianidina-3-glucose; DpS1- solução 1 da delphinidina-3-glucose; DpS2 – solução 2 da delphinidina-3-glucose; MvS1 – solução da malvidina-3-glucose; MvS2 – solução 2 da malvidina-3-glucose.



Anexo XIII. Valores de RMSd para os hemiacetais das antocianinas durante a simulação de dinâmica molecular. CyS1 – solução 1 da cianidina-3-glucose; CyS2 – solução 2 da cianidina-3-glucose; DpS1- solução 1 da delphinidina-3-glucose; DpS2 – solução 2 da delphinidina-3-glucose; MvS1 – solução da malvidina-3-glucose; MvS2 – solução 2 da malvidina-3-glucose.



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas:
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____

